

(19) **FEDERAL REPUBLIC
OF GERMANY**

(LOGO)

Bill of Disclosure

(10) DE 101 17 866 A1

(51) Int. Cl. 7:
G 01 N33/543
G 01 N 33/50
G 01 N 33/53
G 01 N 33/563
C 12 Q1/00
C 12 M 1/34

(21) File No.: 101 17 866.2

(22) Date of Application: 10. 4.2001

(43) Date of Disclosure: 17.10.2002

GERMAN PATENT OFFICE

(71) Applicant:
Nanotype GmbH, 82166 Gräfelfing, DE

(74) Representative:
Eisenführ, Speiser & Partner, 80335
Munich

(72) Inventor:
Gaub, Hermann, Prof., 83727 Schliersee, DE

(56) The publications that should be used as
reference for the assessment:
DE 199 38 369 A1
US 59 92 226. A
WO 93 19 371 A1
MOY, Vincent, T., et.al.:intermolecular Forces
and Energies Between Ligands and Receptors
In: Science Vol. 266, 14 Oct. 1994, S 257-259;

The following statements were derived from the documents that were submitted by the applicant.

(54) A procedure and a device for the characterization and/or as reference of a binding complex.

(57) A procedure for the characterization and/or as reference of a binding complex shows the following steps:

The supplying of a first binding partner and a conjugation from a second and a third binding partner for supplying a forth binding partner,
Create a chaining of the binding partners in which the first binding partner creates a sample complex with the second binding partner and the third partner creates a reference complex with the fourth partner.

Emitting a force to the chaining, which leads to the separation of the sample complex, or the reference complex.

Determining which of both binding complexes were separated.

Patent Claims.

1. A procedure for the characterization and/or as reference of a binding complex with the steps:
The supplying of a first binding partner and a conjugation from a second and a third binding partner
for supplying a forth binding partner,
Creating a chaining of the binding partners in which the first binding partner creates a sample
complex with the second binding partner and the third partner creates a reference complex with the
fourth partner.
Emitting a force to the chaining, which leads to the separation of the sample complex, or the
reference complex and
Determining which of both binding complexes was separated.



⑯ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑯ Offenlegungsschrift
⑯ DE 101 17 866 A 1

⑯ Int. Cl. 7:
G 01 N 33/543

G 01 N 33/50
G 01 N 33/53
G 01 N 33/563
C 12 Q 1/00
C 12 M 1/34

⑯ Aktenzeichen: 101 17 866.2
⑯ Anmeldetag: 10. 4. 2001
⑯ Offenlegungstag: 17. 10. 2002

DH

⑯ Anmelder:
Nanotype GmbH, 82166 Gräfelfing, DE

⑯ Vertreter:
Eisenführ, Speiser & Partner, 80335 München

⑯ Erfinder:
Gaub, Hermann, Prof., 83727 Schliersee, DE

⑯ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
zu ziehende Druckschriften:
DE 199 38 369 A1
US 59 92 226 A
WO 93 19 371 A1
MOY, Vincent, T., et.al.: Intermolecular Forces
and Energies Between Ligands and Receptors. In:
Science, Vol. 266, 14. Oct. 1994, S.257-259;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑯ Verfahren und Vorrichtung zur Charakterisierung und/oder zum Nachweis eines Bindungskomplexes
⑯ Ein Verfahren zur Charakterisierung und/oder zum Nachweis eines Bindungskomplexes weist folgende Schritte auf:
Bereitstellen eines ersten Bindungspartners und eines Konjugats aus einem zweiten und einem dritten Bindungspartner und Bereitstellen eines vierten Bindungspartners,
Bilden einer Verkettung der Bindungspartner, wobei der erste Bindungspartner mit dem zweiten Bindungspartner einen Probenkomplex und der dritte Bindungspartner mit dem vierten Bindungspartner einen Referenzkomplex ausbildet,
Aufbringen einer Kraft an die Verkettung, die zur Trennung des Probenkomplexes oder des Referenzkomplexes führt und
Bestimmen, welcher der beiden Bindungskomplexe getrennt wurde.

DE 101 17 866 A 1

DE 101 17 866 A 1

DE 101 17 866 A 1

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Charakterisierung und/oder zum Nachweis eines Bindungskomplexes, insbesondere mittels Unterscheidung molekularer Trennkräfte durch einen differentiellen Krafttest

5

Bindetests auf der Basis von Gleichgewichtskonstanten

[0002] Nicht-kovalente Wechselwirkungen zwischen Molekülen beruhen auf der atomaren Interaktion von Bindungspartnern durch Wasserstoffbrücken, ionische, hydrophobe und vander-Waals Kräfte. Schwache Wechselwirkungen sind 10 Größenordnungen geringer als kovalente Bindungen, die durch chemische Reaktionen gebildet oder gelöst werden.

[0003] Nicht-kovalente Wechselwirkungen zwischen Bindungspartnern mit einem hohen Grad an selektiver Bindeeigenschaft sind die Voraussetzung für die molekulare Erkennung, die man sich in der chemischen Analytik und der Diagnostik zu Nutze macht. Im Folgenden werden solche Wechselwirkungen als spezifische Wechselwirkungen bezeichnet. Bei den Verfahren zum Nachweis oder der Charakterisierung biochemischer Moleküle handelt es sich meistens um Bindetests.

[0004] Ein Bindetest basiert auf der Ausbildung eines Bindungskomplexes durch die spezifische Wechselwirkungen eines Liganden mit einem Rezeptor und dem Nachweis dieses Komplexes.

[0005] Bei diagnostischen Bindetests kommt es darauf an, eine bekannte Substanz in einer Probe nachzuweisen:

20

- Die Identität einer Probesubstanz zu bestimmen
- Eine Probesubstanz in einem komplexen Probegemisch nachzuweisen
- Varianten einer Probesubstanz zu unterscheiden
- Die Konzentration einer Probesubstanz zu bestimmen

25 [0006] Bei Bindetests für die Entwicklung neuer Diagnostika oder Therapeutika kommt es darauf an, zu einem bestimmten Bindungspartner einen passenden, noch unbekannten zweiten Bindungspartner zu finden, d. h.:

Aus einer Vielzahl von Probesubstanzen diejenige zu identifizieren, die an einen bestimmten Rezeptor bindet
Die Bindungskonstante der Probesubstanz zum Rezeptor zu bestimmen
30 Weitere Bindungseigenschaften wie die Rate der Assoziation (on rate) oder der Dissoziation (off rate) zu bestimmen

[0007] In der Immunodiagnostik handelt es sich bei den Rezeptoren i. d. R. um Antikörper oder Antikörperderivate, mit denen Antigene von Proteinen, niedermolekulare Substanzen aber auch Viren und ganze Zellen nachgewiesen werden können.

[0008] In der molekularen Diagnostik spricht man bei dem Rezeptor von einer Sonde, die aus einer Nukleinsäure wie DNA oder RNA besteht und mit der Nukleinsäuren in einer Probe nachgewiesen werden.

[0009] Der verbreitetste immunodiagnostische Test ist der enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Beim ELISA wird ein erster Antikörper auf einer Oberfläche immobilisiert. Er bindet selektiv ein Antigen eines zugegebenen Probegemisches über eine erste Bindestelle (Epitop). Ein zweiter Antikörper, der mit einer Markierung versehen ist und der sich in freier Lösung befindet bindet an ein zweites Epitop des Antigens. Bei einem Separationschritt, wird die Fraktion des markierten Antikörpers abgetrennt, die nicht an das Antigen gebunden hat. Die auf der Oberfläche zurückbleibenden Sandwich-Komplexe aus erstem Antikörper, Antigen und zweitem Antikörper werden anhand der Markierung nachgewiesen. An die Markierung vermag i. d. R. ein Enzym zu binden, das mittels Bildung eines Farbstoffes das Signal entwickelt. Der Farbstoff ist letztlich das Maß für die Menge des Antigens in der untersuchten Probe.

[0010] Ein typischer molekulardiagnostischer Test ist die Southern-Hybridisierung. Sie beruht auf der Wechselwirkung eines bekannten Nukleinsäuremoleküls, der Sonde, zu einer komplementären Nukleinsäure eines Probengemischs. Die Probe wird auf einer Oberfläche immobilisiert und die markierte Sonde zugegeben. Bei geeigneten Puffer- und Temperaturbedingungen binden die Sondenmoleküle an komplementäre Sequenzen der Probe. Nach Separation der nicht gebundenen Sonde werden die gebildeten Nukleinsäureduplex aus Sonden- und Probemolekülen mittels der Markierung quantifiziert.

[0011] Bei der reversen Southern-Hybridisierung, die Grundlage für die hoch parallele Nukleinsäureanalyse auf miniaturisierten Sondenanordnungen (DNA microarrays) ist, werden die Sondenmoleküle auf der Oberfläche gebunden und markierte Probemoleküle in freier Lösung zugegeben.

[0012] ELISA und Southern-Hybridisierung haben gemeinsam, daß das Bindeeereignis durch eine Markierung nachgewiesen wird und daß einer der Bindepartner auf einer Oberfläche gebunden wird. Eine weitere Eigenschaft, die sie mit allen gängigen Bindetests gemeinsam haben besteht darin, daß man Bindeeigenschaften zweier Bindungspartner zueinander auf der Basis der Größe der Bindungsenergie im resultierenden Bindungskomplex charakterisiert.

60 Modell der molekularen Wechselwirkung

[0013] Die chemische Wechselwirkung zwischen zwei Bindungspartnern läßt sich anhand verschiedener Modelle beschreiben. Das klassische theoretische Gerüst ist die Thermodynamik. Für die Entwicklung der Thermodynamik war ausschlaggebend, daß es lange nicht möglich war molekulare Wechselwirkungen an einzelnen Molekülen zu messen.

65 Deshalb beschreibt sie die Wechselwirkung von Teilchen auf der Basis makroskopisch messbarer Größen. Hieraus resultiert das Konzept der Bindungsenergie, die als die zum Lösen einer Bindung erforderliche Energie definiert ist. Die Bindungsenergie zweier Bindungspartner zueinander kann über die Messung der Konzentrationen von freien und gebundenen Bindungspartnern über die Gleichgewichtskonstante abgeleitet werden.

DE 101 17 866 A 1

[0014] Ein grundlegend anderes Konzept zur Charakterisierung molekularer Wechselwirkung wurde durch die Kraftmessung, z. B. mit dem Atomic Force Microscope, an einzelnen Molekülen ermöglicht. Die Kräfte, die zwischen den Atomen zweier Bindungspartnern ausgebildet werden, können experimentell durch die aufzuwendende Trennkraft bestimmt werden. Aus der Ratenabhängigkeit der Trennkräfte kann unter bestimmten Voraussetzungen das Bindungspotential eines Bindungskomplexes rekonstruiert werden. Im Gegensatz zu einer Charakterisierung eines Bindekplexes anhand seiner Bindungsenergien, ist der Zerfall des Komplexes bei einer Kraftmessung nicht durch die thermische Anregung sondern durch einen manipulativen Eingriff bedingt. 5

[0015] Zur Erläuterung des Bindungspotentials, wird hier ein stark vereinfachtes Bindungsmodell beschrieben.

[0016] Ein Bindungskomplex ist nicht alleine durch seine Bindungsenergie charakterisiert. Er besitzt auch eine für ihn charakteristische Aktivierungsbarriere welche seine Binde- und Zerfallswahrscheinlichkeit bestimmt. Auch besitzt jeder Bindungskomplex eine definierte räumliche Struktur. Eine diese Struktur beschreibende charakteristische Größe ist die Bindungslänge oder Potentialweite. Diese Größen lassen sich in folgendem einfachen Modell des Bindungspotentials zusammenfassen, das in Fig. 1 dargestellt ist. 10

[0017] Im gebundenen Zustand sitzt der Ligand im Minimum des Potentials. Um den Komplex aufzubrechen muß der Ligand über die Potentialbarriere aus der Bindungstasche bzw. aus dem Bindungspotential herausgezogen werden. Die dazu nötige Kraft ist bestimmt durch die Ableitung des Potentials (Steigung). 15

[0018] Dem mechanischen Aufbrechen ist ein spontaner Zerfall des Komplexes durch thermische Aktivierung überlagert. Dieser spontane Zerfall ist abhängig von der Aktivierungsbarriere ΔG . Eine an den Komplex angelegte Kraft erniedrigt die noch zu überwindende Aktivierungsbarriere. Bei jeder anliegenden Kraft besitzt der Komplex damit eine gewisse Wahrscheinlichkeit innerhalb einer bestimmten Zeit zu zerfallen. Die Kraft, bei der ein Komplex tatsächlich zerfällt, hängt daher auch davon ab, wie schnell die Kraft angelegt wird. Steigert man die angelegte Kraft kontinuierlich mit einer festen Kraftrate r bis der Komplex zerfällt, erhält man folgende mittlere Trennkraft für den Komplex in Abhängigkeit von der angelegten Kraftrate: 20

$$F = \frac{kT}{\Delta x} \cdot \ln \left[\frac{\Delta x \cdot r}{k_{\text{Zerfall}} \cdot kT} \right] \quad 25$$

[0019] Bestimmt man unter verschiedenen Kraftraten jeweils die mittlere Trennkraft, läßt sich daraus die für den Bindungskomplex charakteristische Bindungsweite Δx und die Zerfallsrate k_{Zerfall} des Komplexes bestimmen. 30

[0020] Das Messen von Trennkräften stellt daher einen neuen Zugang zur Charakterisierung von Bindungskomplexen dar. 35

Methoden der molekularen Kraftmessung

[0021] Obwohl die große Mehrheit der Bindetests selektive Wechselwirkungen auf der Basis von Bindungsenergien nachweist, gibt es Beispiele für Methoden die sich die Vorteile der charakteristischen Trennkräfte der Bindungskomplexe zu eignen machen. 35

[0022] Das erste Beispiel für eine solche Vorrichtung ist der "surface force apparatus" (SFA) der 1976 von Israelachvili entwickelt wurde (Patent US 5861954, 1999, Israelachvili). Mit diesem Apparat können Adhäsionskräfte zweier Molekülschichten zueinander gemessen werden. Jede der Probesubstanzen wird hierzu auf ein zylindrisch gebogenes Glimmerblättchen aufgebracht, die im Idealfall in nur einem Punkt in Berührung gebracht werden. Durch eine genau kontrollierte Bewegung der Glimmeroberflächen zueinander werden Kräfte zwischen den molekularen Schichten angelegt. Mißt man die Bewegung der Oberflächen zueinander in Abhängigkeit der angelegten Kraft, so erhält man eine Aussage über die Adhäsionskräfte zwischen den beiden molekularen Schichten. 40

[0023] Bei der zweiten Methode zur Messung molekulärer Kräfte handelt es sich um das "atomic force microscope" (AFM). Mit dem AFM gelang die erste Bestimmung der Trennkraft einer schwachen Wechselwirkung eines biologischen Rezeptor-Ligand-Paars, dem Biotin-Streptavidin-System (E.-L. Florin, V. T. Moy and H. E. Gaub, Science 264, 415 (1994)). Im Gegensatz zum SFA werden beim AFM keine makroskopischen Oberflächen in Kontakt gebracht. Die Spitze eines AFM ist nur wenige Nanometer groß und kann sich an ihrem Ende im Idealfall auf ein einzelnes Atom zuspitzen. Im Bestfall kann man zwischen einer AFM Spitze und einer zweiten Oberfläche einzelnes Molekül, z. B. einen DNA-Doppelstrang, anhängen. Wird die Spitze nun von der Oberfläche weggezogen, so kommt es zur Spannung des Moleküls und zur Verbiegung des AFM-Cantilevers, die bei bekannter Federkonstante des Cantilevers eine Messung der molekularen Bindekräfte erlaubt. 45

[0024] Eine Abwandlung der AFM-Methode, die in Richtung diagnostischer Anwendung zielt wird in Patent US 5992226; Lee et al. beschrieben. Hier ist die Probe satt auf einer flachen Oberfläche zwischen einem spitz auslaufenden Vorsprung und der AFM-Spitze gebunden, bzw. einer Oberfläche auf dem AFM-Cantilever gebunden wird. 55

[0025] Eine dritte Methode zur Charakterisierung molekularer Kräfte basiert auf der Verwendung mikroskopisch kleiner magnetischer Kugeln. Man bindet einen Rezeptor auf einer magnetischen Kugel und läßt diesen mit einem Liganden, der wiederum an einer Oberfläche gebunden ist, einen Bindungskomplex bilden. Setzt man die Magnetkugel einem definierten magnetischen Feld aus, so kann man eine definierte Zugkraft an den Bindungskomplex zwischen Kugel und Oberfläche anlegen. Beobachtet man die Position der Magnetkugel in Richtung der Zugkraft, während man diese variiert bis es zur Trennung des Bindungskomplexes kommt, so kann man die Trennkraft bestimmen, die benötigt wird um Rezeptor und Ligand auseinanderzureißen. 60

[0026] Der Nachweis von Trennkräften mit Magnetkugeln leitet sich von einem immunologischen Sandwichtest ab, bei dem die Kräfte nur zur Separation von ungebundenen und gebundenem Ligand eingesetzt werden (Patente US 5445970 und US 5445971, 1995, Rohr). Ein weitergehender Ansatz sieht eine Feinabstimmung der Zugkräfte vor, so daß prinzipiell schwache spezifische Bindungen eines Antigens zu einem Antikörper von starken unterschieden werden 65

können (Patent WO 9936577, 1999, Lee).

[0027] Bei der vierten Methode handelt es sich um eine Kraftmessung mit "optischen Pinzetten" (Optical Tweezers). Die Grundlagen dieser Technik gehen auf Arthur Ashkin zurück. Die Ausübung der Zugkraft wird hier durch die Bewegung eines stark fokussierten Laserstrahls ausgeübt, der einen mikroskopischen Partikel einfangen und bewegen kann.

5 [0028] Eine Anwendung der Optical Tweezers zur Kraftmessung für diagnostische Zwecke wurde durch Kishore beschrieben, (Patent US 5620857, 1997, Kishore et al.)

[0029] Die fünfte Methode beruht auf der Adhäsion eines elastischen Stempels (Conformal Pillar), der mit einer Probesubstanz beschichtet ist zu einer Oberfläche, die mit einer Sonde beschichtet ist. Beim wieder Ablösen des Stempels von der Oberfläche können Trennkräfte gemessen werden, die der Identifikation der Probe dienen (Patent EP 0962759; 10 1999, Delamarche et al.). Bindungskomplexe anhand von Trennkräften statt an Bindungsenergien zu charakterisieren bringt einige bedeutende Vorteile. Über die Potentialweite der Bindung erhält man einen neuen unabhängigen Parameter zur Charakterisierung der Bindung, der es erlaubt verschiedene Bindungsmodi, die gleiche Bindungsenergien besitzen voneinander zu unterscheiden. Dies gilt insbesondere für die Unterscheidung von unspezifischen von spezifischen Bindungen bei Proteinen, sowie für die Diskriminierung zwischen Nukleinsäureduplexen, die vollständig komplementär 15 sind bzw. Fehlpaarungen aufweisen. Ein weiterer Vorteil liegt darin, das Assoziationsraten und Dissoziationsraten bestimmt werden können, was mit herkömmlichen Bindetests schwierig ist.

[0030] Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren und eine Vorrichtung bereitzustellen, das bzw. die einen einfachen Test ermöglicht.

[0031] Diese Aufgabe wird mit den Merkmalen der Patentansprüche gelöst.

20 [0032] Ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung ist es die beschriebenen Vorteile von Bindetests, die auf der Unterscheidung von Trennkräften beruhen für ein breites Anwendungsfeld und die kommerzielle Nutzung zugänglich zu machen, was durch den bisherigen Stand der Technik nicht möglich war.

[0033] Die Erfindung hat Vorteile gegenüber herkömmlichen Kraftdiskriminierungsmethoden. Die herkömmlichen Methoden der molekularen Kraftmessung sind Weiterentwicklungen von Methoden, die ursprünglich einem völlig anderen Zweck dienten. Der SFA wurde für Oberflächenkräfte, AFM für die Abbildung von Oberflächen, Magnetkugeln für die Separation von Molekülen und die Conformal Pillar Methode zum Strukturieren von Oberflächen entwickelt.

25 [0034] Ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung ist einen Krafttest bereitzustellen, der Binde-eigenschaften eines Bindungskomplexes durch simultanes testen vieler nicht kooperativer Einzelereignisse testen kann.

[0035] Bei Methoden mit magnetischen Kugeln (magnetic beads) erhält man i. d. R. Trennkräfte, die auf mehreren kooperativen Ereignissen beruhen, da mehrere Bindungskomplexe an einer Kugel befestigt werden.

[0036] Ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung ist ein Krafttest, bei dem die Trennung des Bindungskomplexes und die Detektion des Ergebnisses zeitlich getrennt sind (einmalig). Dies resultiert in einem einfachen apparativen Aufbau und einer hohen Flexibilität bei der Auswahl der Detektionsmethode.

[0037] Ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung ist ein Krafttest, der keinen komplexen apparativen Aufbau erfordert und dessen Durchführung keine Experten erfordert. Dies ist vergleichbar mit conformal pillar.

[0038] Ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung ist ein Krafttest, der eine hohe parallele Messung vieler verschiedener Proben ermöglicht.

[0039] Ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung ist ein Krafttest, bei dem Zugkräfte realisierbar sind, die weit über dem der Optical Tweezers und dem der magnetischen Kugeln liegen.

40 [0040] Ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung ist eine schnellere Bindungskinetik der Bindepartner bereitzustellen, als sie bei einem Verfahren wie dem ELISA möglich ist, bei dem die Kinetik durch die Diffusionsgeschwindigkeit der in freier Lösung befindlichen Reaktionspartner limitiert ist.

[0041] Im Gegensatz zu den beschriebenen Methoden handelt es sich bei der vorliegenden Erfindung um eine Technik, die von Anfang an für die Bestimmung von Bindungspotentialen konzeptioniert wurde, und die gegenüber dem Stand der 45 Technik bedeutende Vorteile bietet. Der Surface Force Apparatus von Israelachvili ist nicht für die Analyse von Biomolekülen geeignet. Der apparative Aufbau ist ausgesprochen komplex und teuer und schon deshalb für diagnostische Anwendungen kaum geeignet. Eine parallele Messung verschiedener Substanzen ist nicht beschrieben und dürfte nur schwer zu verwirklichen sein.

[0042] Der Hauptvorteil des Atomic force Microscope ist seine hohe Kraftauflösung. Der komplexe apparative Aufbau führt jedoch zu hohen Anschaffungskosten und auch die Handhabung, die einen Experten erfordert, macht dieses Gerät ungeeignet für eine Nutzung außerhalb der Grundlagenforschung. Eine weitere Einschränkung besteht darin, das ein statistisch gesichertes Meßergebnis eine Vielzahl von sequentiellen Experimenten erfordert und deshalb mit einem großen Zeitaufwand verbunden ist. Auch hinsichtlich einer der wichtigsten Anforderungen an ein diagnostisches Meßverfahren, der parallelen Messung vieler verschiedener Probesubstanzen, hat das AFM eine inhärente Nachteil.

55 [0043] Der Einsatz von magnetischen Kugeln ist problematisch hinsichtlich der Ausübung von Kräften. Praktikable Partikelgrößen und Feldstärken erlauben keine Kräfte, die imstande wären einen DNA-Duplex auseinander zu ziehen, was diese Methode von dem Einsatz in der molekularen Diagnostik ausschließt. Die selbe Problematik gilt für die Verwendung von Optical Tweezers. Die realisierbaren Zugkräfte liegen hier deutlich unter 100 pN und sind somit viel zu gering um einen DNA-Duplex testen zu können.

60 [0044] Die Conformal-Pillar-Methode verwendet kleine Stempelchen, die mit einem der Bindungspartner beschichtet sind und die gleichzeitig als Lichtleiter zur Detektion der Ablösung des Stempelchens von der zweiten Oberfläche dienen. Die Miniaturisierung der Stempelchen ist somit limitiert, da sie mindestens die Abmessung der Wellenlänge des verwendeten Lichtes haben müssen. Ein weiterer Nachteil der Conformal Pillar besteht darin, daß das Zerreißen der Bindungskomplexe nicht unabhängig, d. h. kooperativ erfolgt, was zu einer Verschlechterung der Meßstatistik führt.

65 [0045] Die vorliegende Erfindung vereinigt mehrere Eigenschaften auf sich, die in dieser Weise keine herkömmliche Methode aufweisen kann

Ein einfacher und günstiger apparativen Aufbau

Eine einfache Handhabung

DE 101 17 866 A 1

Eine hohe Kraftauflösung bei simultaner Messung einer Vielzahl von Bindeereignissen
Nicht limitierte Zugkraft.

Nicht kooperatives simultanen Testen vieler Bindungskomplexe

[0046] Die Möglichkeit viele gleichartige Probenkomplexe während eines Meßvorganges gleichzeitig zu testen, wobei das Ergebnis für jeden Komplex unabhängig von den anderen Komplexen ausfällt, also nicht-kooperativ ist, ist als einer der Hauptvorteile der Erfindung anzusehen. Bei den beschriebenen Methoden mit dem conformal pillar oder mit magnetischen Kugeln handelt es sich stets um kooperative Ereignisse, da eine Trennung einiger der Komplexe sich auf die Trennwahrscheinlichkeit der verbleibenden Komplexe auswirkt. Die Information über die Einzelereignisse geht dabei verloren.

[0047] Die zur Beschreibung der Erfindung verwendeten Begriffe werden folgendermaßen definiert:

5

Aufhängung: Verbindung eines Bindungspartners mit einer Halteeinrichtung.

Bindeneigenschaften: Verhältnis zweier Bindungspartner zueinander wie: keine Bindung; Bindungsaffinität; Bindungsmodus.

Bindungskomplex: Komplex aus mehreren Bindepartnern; Molekülen oder Körpern oder Körpern und Molekülen die miteinander in Wechselwirkungen stehen und die durch eine Zugkraft getrennt werden können.

15

Bindungspartner: Bestandteil eines Bindungskomplexes, der durch Zugkräfte von einem anderen Bindungspartner getrennt werden kann. Bindungspartner können spezifisch oder unspezifisch miteinander wechselwirken. Die Wechselwirkung ist nicht-kovalent.

Biomoleküle: Moleküle die aus biologischen Systemen gewonnen werden bzw. künstliche Moleküle die solchen aus biologischen Systemen gleichen.

20

Konjugat: Verbindung von zwei Bindungspartnern.

Verbindung: Verbindungselement eines Konjugats.

Referenzkomplex: Bindungskomplex mit einer bekannten Trennkraft.

Ligand: Einer der Bindungspartner eines spezifischen Bindungskomplexes.

25

Mittlere Trennkraft: Arithmetisches Mittel der Trennkräfte mehrerer gleichartiger Bindungskomplexe, deren individuelle Trennkraft aufgrund der thermischen Anregung variiert.

Probc (target): Molekül, Polymer, usw. das einen Probenkomplex ausbilden kann.

Probenkomplex: Bindungskomplex der zu charakterisieren/nachzuweisen ist. Entweder handelt es sich um zwei bekannte Bindungspartner, deren Bindungseigenschaften bestimmt werden sollen oder es handelt sich um einen bekannten Bindungspartner. Es kann sich um eine unbekannte oder eine bekannte Trennkraft handeln.

30

Rezeptor: Einer der Bindungspartner eines spezifischen Bindungskomplexes.

Separation: Bindungspartner die keinen Bindungskomplex eingegangen sind von solchen absonder, die einen Bindungskomplex eingegangen sind.

Spezifische Wechselwirkung: Molekulare Wechselwirkung zwischen zwei Bindungspartnern eines Bindungskomplexes, die sich durch ein hohes Maß an molekularer Erkennung auszeichnet.

35

Trennkraft (unbinding force): maximal nötige Kraft um einen Bindungskomplex mechanisch zu trennen.

Verkettung: lineare Anordnung eines ersten Bindungspartners, der an einen zweiten Bindungspartner eines Konjugats bindet und eines dritten Bindungspartners der Bestandteil des Konjugats ist und der einen vierten Bindungspartner bindet.

[0048] Die Erfindung wird nachstehend anhand von Beispielen und der Zeichnungen näher erläutert.

40

[0049] Es zeigen

[0050] Fig. 1 ein vereinfachtes Bindungspotential eines Bindungskomplexes.

[0051] Fig. 2 das Prinzip des differentiellen Krafttest. Nach der Ausübung einer Zugkraft auf das Konjugat aus B1 und B2, kommt es zum Zerreissen von B1 falls $F_1 > F_2$ oder zum Zerreissen von B2 falls $F_1 < F_2$.

45

[0052] Fig. 3 die Unterscheidung zwischen unspezifischen Wechselwirkungen mit einem Körper und spezifischen Wechselwirkungen mit einem Bindungspartner,

[0053] Fig. 4 die Unterscheidung eines vollständig gepaarten Nukleinsäureduplexes von einem unvollständig gepaartem,

50

[0054] Fig. 5 die simultane Ausführung eines vergleichenden Krafttests an fünf unabhängigen, gleichartigen Bindungskomplexen im Sandwichformat. Die Probe verfügt in diesem Fall über die Bindungspartner BP2 und BP3. Die Probe ist mit einer Markierung versehen. Da $F_1 > F_2$ ist, zerreißen überwiegend die Bindungskomplexe B2, und

[0055] Fig. 6 die simultane Ausführung eines vergleichenden Krafttests an fünf unabhängigen, gleichartigen Bindungskomplexen im Captureformat. Die Probe verfügt in diesem Fall an die Oberfläche 1 gebunden. Das Konjugat aus R₁ und R₂ ist mit einer Markierung versehen. Da $F_1 > F_2$ ist, zerreißen überwiegend die Bindungskomplexe B2.

[0056] Fig. 7 zeigt einen Stempelapparat, der zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens geeignet ist. Eine genauere Beschreibung findet sich im Experimentellen Beispiel 1.

55

[0057] Fig. 8 zeigt Darstellungen einer Unterlage (8A) und eines Stempels (8B) nach einem Krafttest zum Vergleich der Komplexe Biotin/Streptavidin und Iminobiotin/Streptavidin (siehe Experimentelles Beispiel 1).

[0058] Fig. 9 zeigt Darstellungen je einer Unterlage (9A und 9C) und eines Stempels (9B und 9D) nach Krafttests zum Vergleich zweiter DNA-Duplex (siehe Experimentelles Beispiel 2). Fig. 9A zeigt die Unterlage bei Experiment 2a, Fig. 9B zeigt den Stempel bei Experiment 2a, Fig. 9C zeigt die Unterlage bei Experiment 2b, Fig. 9D zeigt den Stempel bei Experiment 2b.

60

[0059] Fig. 10 zeigt die Ergebnisse der Auswertung von Unterlage und Stempel nach einem Kraftvergleich, wobei ein DNA-Duplex mit einem identischen Duplex (10C und D) und einem weiteren Duplex (10A und B) verglichen wurde (siehe Experimentelles Beispiel 2).

65

[0060] 10A: Unterlage bei Experiment 2a; 10B: Stempel bei Experiment 2a; 10C: Unterlage bei Experiment 2b; 10D: Stempel bei Experiment 2b. Es handelt sich jeweils um Ausschnitte von Fluoreszenzprofilen.

1. Erster Bindungspartner BP1
2. Zweiter Bindungspartner BP2
3. Dritter Bindungspartner BP3
4. Vierter Bindungspartner BP4
5. Bindungskomplex 1 (B1)
6. Bindungskomplex 2 (B2)
7. Konjugat aus B1 und B2
8. Konjugat des zweiten Bindungspartners BP2 und des dritten Bindungspartners BP3
9. Aufhängung des ersten Bindungspartners BP1
10. Aufhängung des vierten Bindungspartners BP4
11. Verbindung des zweiten Bindungspartners BP2 und des dritten Bindungspartners BP3
12. Vektor der Zugeschwindigkeit
13. Oberfläche 1
14. Oberfläche 2
15. Probe
16. Probe mit dem zweiten Bindungspartner BP2 und dem dritten Bindungspartner BP3
17. Aufhängung der Probe
18. Markierung

20 [0061] Bei der vorliegenden Erfindung handelt es sich um eine Methode, die gegenüber den herkömmlichen Krafttests ein gänzlich unterschiedliches Prinzip der Bestimmung von Trennkräften aufweist.

[0062] Ein differentieller Krafttest besteht aus zwei Bindungskomplexen, die miteinander verkettet sind. Beim Anlegen einer Kraft, die über den Trennkräften der beiden Bindungskomplexe liegt, kommt es zum Zerreissen eines der beiden Bindungskomplexe. Der Bindungskomplex mit der höheren Trennkraft bleibt dabei intakt. Kennt man die Trennkraft eines der beiden Bindungskomplexe, so kann man auf diese Weise darauf schließen, ob die Trennkraft des zweiten Bindungskomplexes größer oder kleiner als die des ersten ist. Der differentielle Krafttest kann für eine Vielzahl von diagnostischen Anwendungen verwendet werden. Die Erfindung eignet sich insbesondere als Methode zum diagnostischen Nachweis oder zur Charakterisierung der Bindeeigenschaften von biochemischen Molekülen bzw. Molekülen mit einem hohen Grad an spezifischer molekularer Erkennung.

25 [0063] Bei der vorliegenden Erfindung erfolgt die Charakterisierung von Bindeeigenschaften von Bindungspartnern auf Basis der Trennkraft, die für das Trennen ihres Bindungskomplexes notwendig ist.

[0064] Zur Charakterisierung der Trennkraft F_1 die für die Trennung eines Bindungskomplexes B1 (5) aufgewendet werden muß, durch den Vergleich mit der bekannten Trennkraft F_2 die zur Trennung eines zweiten Bindungskomplexes B2 (6) aufgewendet werden muß. Beide Bindungskomplexe sind zu einem Konjugat verbunden an dessen beiden Seiten man eine Zugkraft anlegt. Hervorzuheben ist, daß die Zugkraft auf die beiden seriell angeordneten Bindungskomplexe gleich groß ist. Überschreitet die Zugkraft einen Wert, der über dem einer der Trennkräfte (F_1 oder F_2) liegt, so kommt es zur Trennung der Bindepartner desjenigen Bindungskomplexes dessen Trennkraft geringer ist. Kommt es z. B. zur Trennung des Bindungskomplexes B1 so folgt daraus, daß $F_1 < F_2$ war. Wurde B2 getrennt, so folgt daß $F_1 > F_2$ war. Fig. 2 zeigt das Prinzip des Krafttests.

30 [0065] Bei dem Bindungskomplex B1 (5) handelt es sich in der Regel um einen Probenkomplex, d. h. einen Bindungskomplex, dessen Bindungseigenschaften charakterisiert werden sollen oder bei dem ein Bindungspartner über eine bekannte Bindeeigenschaft mit einem anderen Bindungspartner nachgewiesen werden soll. Es kann sich jedoch auch um eine undefinierte, unspezifische Wechselwirkung zwischen zwei Bindungspartnern oder zwischen einem Bindungspartner und einem Körper handeln.

35 [0066] Bei B2 (6) handelt es sich i. d. R um einen Referenzkomplex, d. h. um einem Bindungskomplex dessen Bindeeigenschaften, insbesondere eine Trennkraft, bekannt sind.

[0067] Bei dem vorhergehend beschriebenen Prinzip handelt es sich nicht um eine "Messung" im engeren Sinne, sondern vielmehr um ein "Lehren". Nach der Deutschen Industrienorm beschreibt der Begriff "Lehren" ein Prüfverfahren, bei dem der zu prüfende Gegenstand mit der einer bekannten Größe eines anderen Gegenstandes verglichen wird. In diesem Sinne wird auch bei der vorliegenden Erfindung die Trennkraft des Bindungskomplexes B1 mit einer zweiten bekannten Trennkraft verglichen. Beim "Messen" handelt es sich hingegen um ein Prüfverfahren, bei dem die zu bestimmende Größe einen konkreten Zahlenwert auf der Maßskala ergibt. Dies entspricht dem Sachverhalt einer Kraftmessung mit dem AFM oder mit einer der anderen Methoden des Standes der Technik.

40 [0068] Die Besonderheit der vorliegenden Erfindung liegt darin, daß jedem zu testenden Probenkomplex eine Kraftlehre im nanoskopischen Maßstab, der Referenzkomplex zugeordnet ist. Jeder Probenkomplex wird unabhängig getestet, das Ergebnis vieler Einzeltest ergibt schließlich das Meßergebnis. Eine Besonderheit, die aus diesem Prinzip folgt, ist die Möglichkeit die Trennung der Bindungskomplexe und die Detektion zeitlich getrennt ausführen zu können.

45 [0069] Die Erfindung berücksichtigt insbesondere die thermische Anregung. Aus dem anfangs erörterten Modell der molekularen Wechselwirkung (Fig. 1) ist es ersichtlich, daß die Trennkraft, die benötigt wird um den Bindungskomplex B1 bzw. einen weiteren Bindungskomplex B2 zu trennen variiert, da die Wechselwirkung zwischen den Bindungspartnern einer thermischen Anregung unterliegt. Deshalb wird gemäß der vorliegenden Erfindung der Vergleich der beiden Bindungspaare vorzugsweise mehrere Male durchgeführt, um einen statistisch gesicherten Mittelwert, die mittlere Trennkraft, bilden zu können, der besagt ob $F_1 > F_2$ oder $F_1 < F_2$ ist. Dies geschieht indem man viele gleichartige Bindungskomplexe gleichzeitig der gleichen Trennkraft aussetzt und bestimmt wieviel der Bindungspartner von B1 und wieviel von B2 getrennt wurden.

50 [0070] Die Erfindung berücksichtigt zusätzlich oder alternativ die Kraftratenabhängigkeit. Ein wichtiger Parameter für die Ausführung eines differentiellen Krafttests ist die Rate der angelegten Zugkraft, da die Trennkräfte F_1 und F_2 bei verschiedenen Kraftraten stark variieren können. Um einen differentiellen Krafttest nach dem oben beschriebenen Prinzip

DE 101 17 866 A 1

reproduzierbar wiederholen zu können ist darauf zu achten, mit nur einer bestimmten Krafrate zu arbeiten.

[0071] Die Krafrate ist bestimmt durch die Geschwindigkeit der Zugkraft und die Elastizität des Konjugats der beiden Bindungskomplexe samt der Aufhängung des ersten Bindungspartners BP1 und des vierten Bindungspartners BP4.

[0072] Je nach Anwendung des differentiellen Krafttests kann man die Krafrate auch bewußt variieren um eine bestimmte Information über einen Bindungskomplex zu erhalten.

5

Anwendungsbeispiele für die Erfindung

1. Unterscheidung von Bindungsmodi

1.1. Unterscheidung von spezifischen und unspezifischen Wechselwirkungen

10

[0073] Ein zentrales Problem von Bindetests bei denen ein erster Bindungspartner auf einer Oberfläche immobilisiert wird, ist das unspezifische Hintergrundsignal. Das unspezifische Hintergrundsignal wird durch Moleküle des zweiten Bindungspartners verursacht, die in freier Lösung zugegeben wurden und unspezifisch an die Oberfläche gebunden haben. Es kommt somit zu einer Überlagerung des spezifischen Signals, derjenigen Moleküle des zweiten Bindepartners, die spezifisch an den ersten Bindungspartner gebunden haben. Da unspezifische und spezifische Wechselwirkungen mit ähnlich großen Bindungsenergien binden können, ist es schwierig sie durch einen Bindetest, der auf der Diskriminierung von Bindungsenergien beruht zu unterscheiden.

15

[0074] Fig. 3 zeigt einen differentiellen Krafttest zur Unterscheidung von unspezifischer und spezifischer Bindung. Das Konjugat aus BP2 und BP3 bindet unspezifisch an der Oberfläche und spezifisch mit dem an der Oberfläche immobilisierten Bindungspartner BP1 mit dem er den Bindungskomplex B1 ausbildet. BP4 bildet mit BP3 einen Bindungskomplex B2. Für eine bestimmte Krafrate ist die Trennkraft F_2 des Bindepaares B2 größer als die unspezifische Trennkraft des Komplexes zur Oberfläche. Die spezifische Trennkraft F_1 von BP2 und BP1 ist jedoch größer als F_2 . Nach dem Anlegen der Zugkraft kommt es deshalb zur Abtrennung des unspezifisch gebundenen Komplexes, jedoch nicht des spezifisch gebundenen.

20

1.2. Unterscheidung schwächerer spezifischer Bindungen von stärkeren spezifischen Bindungen am Beispiel: Unterscheidung einer Einzelbasenfehlpaarung in einem Nukleinsäureduplex von einer vollständigen Paarung

30

[0075] Ein wesentliches Problem bei der Unterscheidung von Nukleinsäuresequenzvarianten durch eine reverse Southern-Hybridisierung besteht darin, Nukleinsäureprobemoleküle, die an die immobilisierte Sonde gebunden haben dahingehend zu unterscheiden, ob sie vollständig komplementär gebunden haben oder eine Einzelbasenfehlpaarung aufweisen. Bei einem Test mit nur einer bestimmten Sonde von ca. 15-25 Basenpaaren können Einzelbasenfehlpaarungen von vollständigen Paarungen auch aufgrund der Bindungsenergien unterschieden werden. Hierzu führt man die Hybridisierung nahe der Schmelztemperatur des vollständig gepaarten Komplexes durch. Unter diesen Bedingungen ist die Fehlpaarung instabil. Bei einer Anordnung mehrerer, Sonden verschiedener Sequenz, wie es bei einer reversen Hybridisierung meist der Fall ist, besteht diese Möglichkeit jedoch nicht.

35

[0076] Fig. 4 zeigt eine Unterscheidung einer vollständigen Basenpaarung von einer Einzelbasenfehlpaarung

40

2. Bestimmung von Dissoziationsraten

[0077] Dissoziationsraten (off rates) zweier Bindungspartner eines Probenkomplexes können bestimmt werden, wenn man einen Probenkomplex gegen mehrere Referenzkomplexe mit verschiedenen Trennkräften bei verschiedenen Krafraten testet.

45

[0078] Die Ausführungen der Erfindung erfolgt mit folgenden Mitteln:

1. Ausübung von Kräften

[0079] Das Ausüben von Zugkräften auf den Konjugat der beiden Bindungskomplexe B1 und B2 kann auf sehr unterschiedliche Weise bewerkstelligt werden, wobei es nicht darauf ankommt von welcher Natur die angelegte Kraft ist.

50

[0080] Bei der bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der Zugkraft um einen mechanischen, makroskopischen Zug. Hierzu wird das Konjugat aus B1 und B2 zwischen zwei Körpern befestigt und diese voneinander wegbewegt, bis es zur Trennung des Komplexes kommt. Die Körper können nanoskopisch klein sein, wie es etwa bei dem Cantilever eines AFM's der Fall ist. Es kann sich jedoch ebenso um makroskopisch große Oberflächen handeln.

55

[0081] Im zweiten Fall werden die Zugkräfte durch magnetische Partikel hervorgerufen, die am Konjugat (7) aus B1 und B2 befestigt sind und auf die ein magnetisches Feld einwirkt. Es kann sich um zwei verschiedene Partikel handeln, die jeweils an einem Ende des Komplexes befestigt sind und die in einem Fall diamagnetisch im anderen Fall paramagnetische Eigenschaften haben.

60

[0082] In einem dritten Fall nutzt man die Möglichkeit das Konjugat aus B1 und B2 mit großen Molekülen oder Polymeren zu verbinden und mittels deren Widerstand in einem Flüssigkeitsstrom Zugkräfte aufzubauen. Dynamische Zugkräfte lassen sich aufbauen, wenn das Konjugat aus B1 und B2 zwischen Partikel gebunden wird, in die sich Schallwellen, insbesondere Ultraschall einkoppeln lassen.

65

[0083] In einem vierten Fall nutzt man den Einfluß eines elektrischen Feldes auf geladene Moleküle, wie dies etwa bei einem elektrophoretischen Verfahren der Fall ist. Das Konjugat aus B1 und B2 wird hierzu zumindest an einem Ende mit einem geladenen Molekül, vorzugsweise einem vielfach geladenen Polymer verbunden. Werden beide Enden mit einem geladenen Molekül verknüpft, so handelt es sich um gegensätzlich geladene Moleküle.

70

[0084] In einem fünften Fall erfolgt das Aufbringen der Kraft durch eine Verkürzung eines Polymers, das die Aufhän-

DE 101 17 866 A 1

gungen der Bindungspartner BP1 und BP2 bzw. der Verbindung zwischen BP2 und BP3 bildet. Die Verkürzung beruht dabei auf einer Konformationsänderung des Polymers, die durch eine Veränderung des chemischen Milieus, z. B. den pH-Wert oder einer Salzkonzentration verursacht wird.

5

2. Variation der Kraftrate

[0085] Die Kraftrate mit der an einem Molekül gezogen wird, wird durch zwei Parameter bestimmt. Zum einen ist es die Federkonstante der Aufhängungen zwischen der Bindungspartner BP1 und BP4 bzw. die Federkonstante der Verbindung zwischen BP2 und BP3, zum zweiten ist es die Ziehgeschwindigkeit. Um die Kraftrate zu variieren, wählt man entweder andere Federkonstante oder eine andere Ziehgeschwindigkeit.

[0086] Die bevorzugte Ausführung zur Variation der Federkonstante einer Aufhängung oder eines Konjugats erfolgt durch die Variation der Länge eines Polymers, das die Aufhängung bzw. die Verbindung bildet.

3. Detektion

15

[0087] Die Detektion hat den Zweck zu bestimmen, welche der beiden Bindungskomplexe eines Konjugats aus B1 und B2 nach dem Anlegen einer Zugkraft getrennt wurden. Dies kann indirekt oder direkt geschehen.

[0088] Ein indirekter Nachweis richtet sich auf einen freien Bindungspartner BP, der vor dem Anlegen der Zugkraft Teil eines Bindungskomplexes B war. Dies erreicht man durch Zugabe einer Sonde, die gegen den freien Bindungspartner gerichtet ist. Kommt es z. B. zur Trennung des Bindungskomplexes B1, so können BP1 oder/und BP2 nachgewiesen werden.

[0089] Beim direkten Nachweis weist man nach, in welche der beiden Zugrichtungen das Konjugat der Bindungspartner BP1 und BP2 nach dem Zerreißen hin verlagert wurde. Zu diesem Zweck wird das Konjugat aus BP1 und BP2 mit einer Markierung versehen.

[0090] Zum Nachweis, welcher der Bindungskomplexe getrennt wurde, können auch zwei verschiedene Markierungen eingesetzt werden. Vorzugsweise wird dazu das Konjugat aus zweitem und drittem Bindungspartner, der zweite Bindungspartner oder der dritte Bindungspartner mit einer ersten Markierung versehen, und der erste oder der vierte Bindungspartner mit einer zweiten Markierung versehen, wobei die zweite Markierung von der ersten Markierung verschieden ist.

[0091] In einer Ausführungsform wird dann die Trennstelle detektiert, indem man die Menge an erster Markierung ermittelt, die an eine der Halteeinrichtungen gebunden ist, die Menge an zweiter Markierung ermittelt, die an dieselbe Halteeinrichtung gebunden ist, und die ermittelten Werte miteinander vergleicht und/oder zueinander in Beziehung setzt. Aus dem Verhältnis der Mengen an erster und zweiter Markierung, die beispielsweise an Stempel oder Unterlage gebunden sind, kann eine Aussage über das Ausmaß der Trennung von Proben- bzw. Referenzkomplex getroffen werden.

[0092] Zum Nachweis der Sonde der indirekten oder der Markierung der direkten Detektion können verschiedenste Methoden des Stand der Technik herangezogen werden. Bei der bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der Markierung um ein fluoreszierendes Molekül. Hier kann auch FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) zum Einsatz kommen, indem man die beiden Bindungspartner eines Bindungskomplexes mit zwei verschiedenen Fluorophoren verseht, zwischen denen ein Resonanztransfer stattfindet. Bei der Trennung der beiden Fluorophore geht das Fluoreszenzsignal verloren. Eine weitere Abwandlung besteht darin, einen der beiden Bindungspartner eines Bindungskomplexes mit einem Fluorophor zu versehen, den anderen mit einem Molekül, das die Fluoreszenz des Fluorophor auslöscht (quenching). Beim Trennen der Bindungspartner wird die Auslösung des Fluorophors aufgehoben, es kommt also zu einer Verminderung des Signals. Als bevorzugte Fluorophore kommen nanoskalige, kolloidale Halbleiterpartikel (quantum dots) zur Anwendung. Weitere Möglichkeiten sind die radioaktive Markierung, die Markierung mit einem Affinitätsmarker an dem ein Enzym bindet, welches das Signal verstärkt, die Chemolumineszenz, elektrochemische Markierungen oder die Massenspektroskopie.

4. Proben

[0093] Der hier beschriebene differentielle Krafttest kann für ein weites Spektrum von Proben eingesetzt werden. Bevorzugt handelt es sich dabei um Proteine, im allgemeinen Antikörper, Antigene, Haptene oder um natürliche und künstliche Nukleinsäuren. Es kann jedoch auch um Viren, Phagen, Zellbestandteile oder ganze Zellen handeln. Des weiteren kommen auch komplexbildende Substanzen wie Chelatoren in Betracht.

55

5. Referenzkomplexe

[0094] Ein Bindungspartner eines Referenzkomplexes kann selbst Bestandteil einer Probe sein, wie es beim Sandwichformat der Fall ist. Ein Referenzkomplex kann im Prinzip aus den gleichen Bestandteilen aufgebaut sein, wie ein Probenkomplex.

60

6. Zeitliche Reihenfolge der Verkettung

[0095] Die Verbindung der Bindungspartner BP2 (2) und BP3 (3) zu einem Konjugat (8) kann erfolgen bevor es zur Wechselwirkung von BP2 und BP3 mit BP1 oder BP4 kommt.

[0096] Alternativ kann das Konjugat aus BP2 und BP3 auch erst gebildet werden, nach dem eine Interaktion mit BP1 und BP4 eingetreten ist.

DE 101 17 866 A 1

Bevorzugte Ausführungsform der Erfindung

[0097] Bei der ersten bevorzugten Ausführungsform der Erfindung bei der das Konjugat aus B1 und B2 zwischen zwei Oberflächen befestigt wird, wird die Zugkraft durch einen mechanisch, makroskopischen Zug angelegt, die Detektion erfolgt direkt über eine Markierung. 5

[0098] Diese Ausführungsform wird hier an den beiden Formaten erörtert, die sich auch durch alle anderen Ausführungsformen verwirklichen lassen, dem Sandwich- und dem Capture-Format:

Beim Sandwichformat des differentiellen Krafttests (Fig. 5) handelt es sich bei dem Konjugat aus BP2 und BP3 um die Probe (15). Ein Bindungspartner BP2 (2) der Probe ist spezifisch für einen Bindungspartner BP1 (1), der auf der ersten Oberfläche (13) gebunden ist. Ein weiterer Bindungspartner BP3 (3) ist spezifisch für einen den Bindungspartner BP4 (4), der auf der zweiten Oberfläche (14) gebunden ist. Bringt man die beiden Oberflächen in Kontakt, so kommt es zur Interaktion der Probe mit BP1 und BP4 wodurch die Oberflächen (13, 14) mittels der entstandenen Bindungskomplexe B1 und B2 verknüpft werden. Zieht man die Oberflächen nun auseinander, so bricht bevorzugt jener der beiden Bindungskomplexe, der die geringere Trennkraft aufweist. Die Probe haftet derjenigen Oberfläche an, zu der noch ein intakter Bindungskomplex besteht. 10

[0099] Beim Captureformat des differentiellen Krafttests (Fig. 6) wird die Probe (15) auf der ersten Oberfläche (13) immobilisiert. Die Probe verfügt über den ersten Bindungspartner BP1 (1), der spezifisch für den zweiten Bindungspartner BP2 (2) ist. BP2 ist mit BP3 (3) zu einem Konjugat verbunden, wobei BP3 einen vierten Bindungspartner BP4 bindet, der auf der zweiten Oberfläche (14) gebunden ist. 15

[0100] Man bringt beide Oberflächen in Kontakt, wodurch es zur Interaktion von BP1 mit BP2 kommt. Zieht man die Oberflächen nun auseinander, so bricht bevorzugt der schwächere der beiden Komplexe, d. h. entweder der Komplex aus BP1 mit BP2 oder der Komplex aus BP3 mit BP4. Die Verteilung des Konjugats aus BP2 und BP3 zwischen den beiden Oberflächen wird bestimmt und gibt Aufschluß darüber, welcher der beiden Komplexe der stabilere war. 20

[0101] Die Anbindung der Probe (15) im Captureformat kann kovalent oder über schwache Wechselwirkungen erfolgen. 25

[0102] Die bevorzugte Vorrichtung zur Ausführung der vorliegenden Erfindung besteht aus:

- i) Einem Verbrauchsmittel, das aus zwei Oberflächen zur Bindung der Reaktionspartner besteht.
- ii) Den Bindungspartnern, die auf den Oberflächen gebunden sind
- iii) Einer Vorrichtung um die beiden Oberflächen in Kontakt zu bringen und sie wieder zu trennen, nachdem es zur molekularen Interaktion der Bindungspartner gekommen ist.
- iv) Einer Markierung des Konjugats der Bindungspartner BP2 und BP3, anhand dessen n Verteilung zwischen den beiden Oberflächen bestimmt werden kann
- v) Einer Vorrichtung zur Detektion der Markierung

35

Experimentelles Beispiel 1

Krafttest zum Vergleich der Komplexe Biotin/Streptavidin und Iminobiotin/Streptavidin

[0103] Das Experiment zeigt, daß durch einen differentiellen Krafttest die Unterschiede in der Trennkraft der Komplexe Biotin/Streptavidin und Iminobiotin/Streptavidin bestimmt werden können. 40

Prinzip

[0104] Biotin- und Iminobiotin werden an einer Unterlage gebunden. Fluoreszenzmarkiertes Streptavidin wird an die immobilisierten Haptene gebunden. Ein Stempel, der mit Biotin beschichtet ist, wird so an die Unterlage angenähert, daß das am Stempel gebundene Biotin das über die Haptene an die Unterlage gekoppelte Streptavidin binden kann. Anschließend wird der Stempel wieder entfernt. Zum Schluß wird bestimmt welcher Anteil des Streptavidins vom Iminobiotin der Unterlage auf das Biotin des Stempels und welcher Anteil des Streptavidins vom Biotin der Unterlage auf das Biotins des Stempels übertragen wurde. 45

[0105] Beim Trennen der Oberflächen muß sich eine der beiden Bindungen lösen. Der Ligand bleibt dabei entweder am Stempel oder der Unterlage gebunden, je nachdem welche der Bindungen mechanisch stabiler ist. 50

Durchführung

55

1. Beschichtung des Stempels

[0106] Es wurde ein mikrostrukturierter Stempel aus PDMS (Polydimethylsiloxan) gefertigt. Die Strukturen bestanden dabei aus Stempelfüßchen von ca. 100 x 100 µm, die durch Vertiefungen von ca. 25 µm Breite und 1 µm Tiefe getrennt wurden. Das in Kontakt bringen des Stempels und der Unterlage setzt voraus, daß der dazwischen befindliche Puffer verdrängt wird. Dies ist bei glatten Flächen nur äußerst schwierig bzw. langsam möglich. Die im Stempel befindlichen Rillen gewährleisten den schnellen Abfluß des Puffers und einen vollständigen Kontakt der Stempelfüßchen mit der Unterlage. 60

[0107] Ein weiterer Vorteil der Mikrostruktur besteht darin, daß auf der Unterlage spiegelbildlich zu den Stempelrillen keine Moleküle "weggestempelt" werden. Der Intensitätswert der verbleibenden "Gitter" repräsentiert die Dichte der Moleküle vor dem Stempeln und kann bei der Auswertung somit als Referenzwert herangezogen werden. 65

[0108] Zur Fertigung des mikrostrukturierten Stempels wurde ein Ansatz aus einer 1 : 10 Mischung von Silikonelastomer und Vernetzungsreagenz (Sylgard 184, Dow Corning) nach mehrfachem Entgasen auf einen entsprechend struktu-

DE 101 17 866 A 1

rierten Silikonwafer gegossen und für 24 h bei RT inkubiert. Nach der Polymerisierung wurde die strukturierte Oberfläche des Stempel bei 1 mbar in einem Plasmaofen für 15 s einem H₂O-Plasma ausgesetzt. Die oxidierte Oberfläche wurde mit 3% Aminosilan (3-Aminopropyltrimethyl-ethoxysilan; ABCR, Karlsruhe) in 10% H₂O und 87% Ethanol für 30 min inkubiert. Die silanisierte Oberfläche wurde mit Reinstwasser gewaschen und mit Stickstoff trocken geblasen.

5 [0109] An die Aminogruppen des Silans wurde ein bifunktionales PEG angebunden dessen eines Ende über eine durch NHS aktivierte Carboxygruppe, das andere über eine Biotingruppe verfügte. 20 µl einer Lösung mit 2 mg/100 µl NHS-PEG-Biotin (Shearwater, Huntsville) wurden unter einem Deckglas für 1 h auf einem Stempel mit einer Fläche von 1 cm² inkubiert. Es wurde mit Reinstwasser gewaschen und mit Stickstoff trocken geblasen.

10 2. Beschichtung der Unterlage

[0110] Ein Glasobjekträger wurde durch 100 minütige Behandlung mit gesättigter KOH-Ethanolösung gereinigt. Die gereinigte Oberfläche wurde mit 3% Aminosilan (3-Aminopropyltrimethyl-ethoxysilan; ABCR, Karlsruhe) in 10% H₂O und 87% Ethanol für 30 min inkubiert. Die silanisierte Oberfläche wurde mit Reinstwasser gewaschen und mit Stickstoff trocken geblasen. An die Aminogruppen des Silans wurde ein bifunktionales PEG angebunden dessen eines Ende über eine durch NHS aktivierte Carboxygruppe, das andere über eine t-Boc geschützte Aminogruppe verfügte (NHS-PEG-NH-tBoc, Shearwater, Huntsville). Anschließend wurde die tBoc Schutzgruppe mit Trifluor Essigsäure abgespalten. Biotin und Iminobiotin (Sigma, St. Louis) wurden aus einer PBS Lösung (Phosphate Saline Buffer; Sigma) mit einer Konzentration von 5 mg/ml mit 5 mg/ml EDC (1-Ethyl-3-(3-Dimethylamino-propyl)carbimid; Sigma) und 5 mg/ml 20 NHS (N-hydroxysuccinimid; Sigma, St. Louis) an die Aminogruppen des entschützten PEGs angebunden. Die Unterlage wurde in einer gesättigten H₂O-Atrmosphäre für 1 h inkubiert, mit Reinstwasser gespült und mit Stickstoff trocken geblasen. Die Unterlage mit den immobilisierten Hapteten wurde mit 0,1 mg/ml Alexa-Fluor®-546-Streptavidin-Konjugat inkubiert, mit Reinstwasser gespült und mit Stickstoff trocken geblasen.

25 3. Stempeln

[0111] Die Stempelprozedur kann mit einem einfachen Apparat erfolgen wie er beispielsweise in Fig. 7 dargestellt ist. Die Apparatur besteht aus einer Bodenplatte (1), zwei Führungsstangen (2), einem Stempelschlitten (3), einer Stempelkopfpolsterung (4), dem Stempelkopf (5) und der Stempelpolsterung (6) (siehe Fig. 7). Die Bodenplatte, die Führungsstangen und der Stempelschlitten können aus Metall gefertigt sein. Das Stempelkopfpolster kann aus einem Schaumgummi und der Stempelkopf aus Plexiglas bestehen. Der Stempel ist quadratisch und hat die Fläche von einem cm² und eine Dicke von 1 mm. Das Stempelpolster hat die gleichen Abmessungen, ist jedoch auf beiden Seiten glatt und besteht z. B. aus einem besonders weichen PDMS.

[0112] Zum Stempeln wird die Unterlage auf die Bodenplatte und der Stempel auf das Stempelpolster gelegt. Beide werden mit Puffer bedeckt. Der Schlitten wird in die Führungsstangen eingeführt und solange per Hand abgesenkt, bis der Stempel mit der Unterlage in Kontakt kommt. Das Trennen erfolgt ebenfalls per Hand.

[0113] Das Stempelkopfpolster hat die Funktion den Stempelkopf beim Aufsetzen des Stempels in eine exakt parallele Position zur Unterlage zu bringen. Das Stempelpolster dient dazu geringe Unebenheiten zwischen Stempel und Unterlage auszugleichen.

[0114] Die Oberflächen wurden so einander angenähert, daß das auf dem Stempel gebundene Biotin mit dem Streptavidin der Unterlage interagieren kann. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurden die Oberflächen voneinander getrennt.

4. Messung

45 [0115] Stempel und Unterlage wurden mit einem Laser-Scanner (Perkin Elmer GeneTAC LS IV) nach dem Marker Alexa-Fluor®-546 abgescannt.

50 Auswertung und Ergebnis

55 1. Der Unterschiedliche Übertrag von Biotin bzw. Iminobiotin nach Biotin spiegelt die unterschiedliche mechanische Stabilität der Streptavidin-Hapten Komplexe wieder. Der Übertrag von Biotin auf Biotin liefert eine 50% Referenz, aus der die Dichte der Kopplungereignisse im angenäherten Zustand bestimmt werden kann.
2. Es werden 15% des an Biotin gebundenen Streptavidins von dem Biotin beschichteten Stempel mitgenommen. Die Effizienz der Kopplung während des Stempelns liegt daher bei 30%. Von Iminobiotin auf Biotin werden 30% übertragen. Die Streptavidin-Biotin Bindung ist also stärker als die Streptavidin-Iminobiotin Bindung, so daß beim Trennen von Stempel und Unterlage das Streptavidin stets am Biotin gebunden bleibt während sich die Bindung zum Iminobiotin löst.

60 [0116] Fig. 8A und 8B zeigen eine Darstellung der Unterlage bzw. des Stempels nach dem Stempeln. Messungen mit dem AFM-Kraftspektrometer ergaben für das Rezeptor-Ligand Paar Biotin/Avidin 160 pN ± 20 pN und 85 ± 15 für Iminobiotin/Avidin (Florin, E. L., Moy V. T. and Gaub H. E. Science 15. April 1994, Vol. 264, pp. 415–417: "Adhesion Forces Between Individual Ligand-Receptor Pairs"). Der Kraftvergleich zwischen Biotin/Streptavidin und Iminobiotin/Streptavidin kommt qualitativ zu dem Ergebnis. Auf der Unterlage in Fig. 8A erkennt man, daß auf den Iminobiotin-Spots der linken Reihe wesentlich weniger Streptavidin gebunden wurde als auf den Biotin-Spots der rechten Reihe. Diese Bild ist spiegelbildlich auf dem Stempel in Fig. 8B wieder zu finden, wobei die Spots der linken Reihe, bei denen eine Verkettung der Art Biotin/Streptavidin/Biotin statt fand, deutlich weniger Streptavidin auf den Stempel übertragen wurde als bei der rechten Reihe, die einer Verkettung Iminobiotin/Streptavidin/Biotin entspricht.

DE 101 17 866 A 1

Experimentelles Beispiel 2

Krafttest zum Vergleich zweier DNA-Duplexe

[0117] Das Experiment zeigt, daß durch einen differentiellen Krafttest die Trennkräfte zweier DNA-Duplexe verglichen werden können. In diesem Beispiel handelt es sich bei Duplex 1 um einen 20 Basenpaare langen Doppelstrang, bei Duplex 3 um einen 30 Basenpaare langen Doppelstrang. 5

Prinzip

[0118] Oligonukleotid 1 (= Oligo1) wird terminal an einer Unterlage gebunden. Oligonukleotid 2 (= Oligo2) wird mit Oligo1 hybridisiert, wobei ein Probekomplex gebildet wird. Oligonukleotid 3 (= Oligo3) wird mit Oligo2 hybridisiert, wobei ein Referenzkomplex gebildet wird. Oligo1 und Oligo2 sind mit unterschiedlichen Fluorophoren markiert. Oligo3 ist mit einem Biotin markiert. Ein Stempel, der mit Streptavidin beschichtet ist wird auf die Unterlage mit den drei hybridisierten Oligos aufgepreßt. Dabei kommt es zur Bindung des Biotin von Oligo3 an das Streptavidin des Stempels. Der Stempel wird entfernt, wobei es in einer Verkettung von Oligo1 mit Oligo2 und Oligo3, entweder zum Zerreßen des Probekomplexes oder des Referenzkomplexes kommt. 10

[0119] Beim Probenkomplex handelt es sich um einen DNA-Duplex von 20 bp. Der Referenzkomplex besteht aus einem DNA-Duplex von 30 bp, von denen 20 mit denen des Probenkomplexes identisch sind. Als Referenz wird ein zweites Experiment durchgeführt, bei dem Proben- und Referenzkomplex 20 bp lang sind und den gleichen GC-Gehalt aufweisen. 20

[0120] Da die Effizienz, mit der Verketten über die Biotin-Streptavidin-Bindung gebildet werden beim Stempeln nur bedingt kontrollierbar ist, kann man sich bei dem Krafttest nicht darauf beschränken nur Oligo2 zu markieren, um mittels dem Ausmaß seiner Anreicherung auf der Stempeloberfläche das Verhältnis der Trennkräfte von Proben- und Referenzkomplex zu berechnen. Man benötigt eine zweite Markierung an Oligo3. Bestimmt man anhand der beiden Markierungen, wieviel Oligo2 im Verhältnis zu Oligo3 auf dem Stempel angereichert, bzw. auf der Unterlage abgereichert wurde, so erhält man ein Maß dafür, ob Oligo2 eine größere Trennkraft zu Oligo1 oder Oligo3 aufweist. 25

[0121] Es ist darauf zu achten, daß bei einer Fluoreszenzmarkierung der Oligos keine Verfälschung des Meßergebnisses durch eine Fluoreszenz-Resonanz-Transfer (FRET) zwischen den Markierungen stattfindet. Da ein geringes Ausmaß von FRET zwischen den Markierungen einer Verkettung oft unvermeidlich ist, ist darauf zu achten, daß die Markierungen innerhalb einer Verkettung bei Experiment und Referenzexperiment den gleichen Abstand voneinander haben. 30

Experiment: 20 bp gegen 30 bp (= Experiment 2a)

5' NH2-AAAAAAA TCTCCGGCTTACGGCGTAT Oligo1
|||||
3' Cy3-AGAGCCGAAATGCCGATA TTGGGGAGCAATGCTAATAGTT TCCCTGAAAGTCGTCCTCAAGACCCCTCGTT Oligo2a
|||||
Oligo3 5' Cy5-AGGGACTTCAAGCAGAGACTCTGGAGCAG AAAAAAAA-Bio

35

40

Referenzexperiment: 20 bp gegen 20 bp (= Experiment 2b)

5' NH2-AAAAAAA TCTCCGGCTTACGGCGTAT Oligo1
|||||
3' Cy3-AGAGCCGAAATGCCGATA TTGGGGAGCAATGCTAATAGTT TCCCTGAAAGTCGTCCTCA Oligo2b
|||||
Oligo3 5' Cy5-AGGGACTTCAAGCAGAGACTCTGGAGCAG AAAAAAAA-Bio

45

50

Durchführung

1. Beschichtung der Unterlage:

Als Unterlage wurden mit Aldehydgruppen funktionalisierte Glas-Objekträger (Telechem, Atlanta: Superaldehyde Slides) verwendet. Als Passivierung gegen die Absorption des Streptavidins des Stempels wurde an die Glasoberfläche kovalent Polycrylynglykol (PEG) gebunden. Dazu wurden 2 mg bifunktionales PEG (Shearwater, Huntsville; Molekulargewicht = 3400 g/mol) mit je einer terminalen Amino- und einer terminalen Carboxygruppe, in 100 µl PBS (Phosphate Saline Buffer, Sigma, St. Louis) gelöst und unter einem Deckglas für 2 h auf dem Objekträger inkubiert. Die aus der Reaktion der Amino- mit den Aldehydgruppen resultierenden Schiffbasen wurden für 5 min mit einer 1%igen NaBH₄-Lsg reduziert. Daraufhin wurde die Unterlage mit Reinstwasser gewaschen und mit einem ölfreien Stickstoffstrahl trocken geblasen. 55

2. Anbindung von Oligo1:

Oligo1: 5' NH2-AAAAAAA TCTCCGGCTTACGGCGTAT (SEQ ID NO:1)

65

Oligo1 verfügt am 5'-Ende über eine Amino-Markierung und einen Spacer aus 10 Adeninen. Die weiteren 20 Basen bilden mit Oligo2 den Probenkomplex. Mehrere Tropfen von je 1 µl einer Mischung aus 25 µM Oligo1 mit 5 mg/ml EDC (1-Ethyl-3-(3-Dimethylamino-propyl)carbimid; Sigma, St. Louis) und 5 mg/ml NHS (N-hydroxysuccini-

DE 101 17 866 A 1

mid; Sigma, St. Louis) in PBS (Phosphate Saline Buffer; Sigma, St. Louis) wurden auf die beschichtete Unterlage gespottet. Die Unterlage wurde in einer gesättigten H₂O-Atmosphäre für 1 h inkubiert, mit 0,2% SDS (Sodiumdodekylsulfat; Sigma St. Louis) gewaschen, mit Reinstwasser gespült und mit Stickstoff trocken geblasen.

3. Hybridisierung:

Oligo2a:

5' TTGCTCCCAGACTCTCTGCTGAAAGTCCCTTGATAATCGAACGAGGGGTTATACGCCGTAAAGCCGGAGA-Cy3

10 (SEQ ID NO:2)

Oligo2b:

15 5' ACTCTCTGCTGAAAGTCCCTTGATAATCGAACGAGGGGTTATACGCCGTAAAGCCGGAGA-Cy3

(SEQ ID NO:3)

Oligo3:

5' CY5-AGGGACTTTCAGCAGAGAGTCTGGGAGCAA AAAAAAAAAA-BIO

(SEQ ID NO:4)

15 Die Oligos 2a und 2b verfügen über eine Cy3®-Markierung (Cyanine3, Amersham-Pharmacia Biotech) am 5'-Ende. Oligo3 verfügt über eine Cy5®-Markierung (Cyanine5, Amersham-Pharmacia) am 5'-Ende (alle Oligos von metabion, Martinsried).

20 10 μ l einer Mischung aus Oligo2a (1 μ M) und Oligo3 (2 μ M) in einem Citrat-Puffer (pH = 7,2) mit 750 mM NaCl wurden unter einem Deckglas über die Spots des angebundenen Oligo1 gegeben. Der Hybridisierungsansatz wurde in einer gesättigten H₂O-Atmosphäre bei 80°C für 15 min inkubiert, dann bei Raumtemperatur (RT) 30 min ankühlen lassen. Die Unterlage wurde einmal mit 15 mM NaCl/O,2% SDS und ein zweites mal mit 15 mM NaCl bei Raumtemperatur gewaschen und in 15 mM NaCl aufbewahrt. Ebenso wurde bei dem Referenzexperiment verfahren, wobei Oligo2a gegen Oligo2b ausgetauscht wurde.

4. Beschichtung des Stempels:

25 15 Es wurde ein mikrostrukturierter Stempel aus PDMS (Polydimethylsiloxan) gefertigt. Die Strukturen bestanden dabei aus Stempelfüßchen von ca. 100 \times 100 μ m, die durch Vertiefungen von ca. 25 μ m Breite und einem μ m Tiefe getrennt wurden. Hierzu wurde ein Ansatz aus einer 1 : 10 Mischung von Silikonelastomer und Vernetzungsreagenz (Sylgard 184, Dow Corning) nach mehrfachem Entgasen auf einen entsprechend strukturierten Silikonwafer gegossen und für 24 h bei RT inkubiert. Nach der Polymerisierung wurde die strukturierte Oberfläche des Stempel bei 1 mbar in einem Plasmaofen für 15 s einem H₂O-Plasma ausgesetzt.

30 20 Die oxidierte Oberfläche wurde mit 3% Aminosilan (3-Aminopropyldimethyl-ethoxysilan; ABCR, Karlsruhe) in 10% H₂O und 87% Ethanol für 30 min inkubiert. Die silanierte Oberfläche wurde mit Reinstwasser gewaschen und mit Stickstoff trocken geblasen. An die Aminogruppen des Silans wurde ein bifunktionales PEG angebunden dessen eines Endes über eine durch NHS aktivierte Carboxygruppe, das andere über eine Biotingruppe verfügte. 20 μ l einer Lösung mit 2 mg/100 μ l NHS-PEG-Biotin (Shearwater, Huntsville) wurden unter einem Deckglas für 1 h auf einem Stempel mit einer Fläche von 1 cm² inkubiert. Es wurde mit Reinstwasser gewaschen und mit Stickstoff trocken geblasen. Auf die nun biotinylierte Oberfläche wurde 0,1 mg/ml Streptavidin (Sigma) in PBS gegeben und für 30 min inkubiert. Es wurde mit Reinstwasser gewaschen und mit Stickstoff trocken geblasen.

5. Stempeln:

35 25 Ein frisch präparierter Stempel und eine Unterlage wurden mit einer Lösung von 15 mM NaCl unter einem Druck von 400 g/cm² auf die Flecken mit den angebundenen Oligos (Oligo1 + Oligo2 + Oligo3) gepreßt. Nach 30 min wurde der Stempel sehr langsam abgehoben. Unterlage und Stempel wurden mit Reinstwasser gewaschen und mit Stickstoff trocken geblasen.

40 30 6. Stempel und Unterlage wurden mit einem Zweifarbst-Laser-Scanner (Perkin Elmer GeneTAC LS IV) nach den Markern Cy3 und Cy5 abgescannt. Um eine Vergleichbarkeit der Meßergebnisse zu gewährleisten wurden die Stempel von Experiment und Referenzexperiment sowie die Unterlagen von Experiment und Referenzexperiment mit gleichen Laserintensitäten gescannt.

45 35

Auswertung

[0122] Für jedes Experiment wurde der Stempel und die Unterlage ausgewertet.

Auswertung der Unterlagen

45 40 [0123] Durch Subtraktion der Intensitäten der gestempelten Flächen von den Intensitäten der nicht gestempelten Rillen wurden die Differenzen Δ Cy3_{Unt} und Δ Cy5_{Unt} gebildet. Aus den beiden Differenzen für Experiment A (Oligo2a) wurde der Quotient $Q_{AUnt} = \Delta$ Cy3_{Unt}/ Δ Cy5_{Unt}, aus den Differenzen für Experiment B (Oligo2b) der Quotient $Q_{BUnt} = \Delta$ Cy3_{Unt}/ Δ Cy5_{Unt}

DE 101 17 866 A 1

$\Delta Cy5_{Unt}$ gebildet. Als Maß für den Unterschied der Abreicherung von Oligo2a bzw. Oligo2b wurde der Quotient $Q_{Unt} = Q_{AU_{Unt}}/Q_{BU_{Unt}}$ gebildet.

Auswertung der Stempel

[0124] Durch Subtraktion der Intensitäten der Rillen, auf die keine Oligos übertragen wurden von den Intensitäten der Stempelflächen wurden die Differenzen $\Delta Cy3_{St}$ und $\Delta Cy5_{St}$ gebildet. Aus den beiden Differenzen für Experiment A (Oligo2a) wurde der Quotient $Q_{ASi} = \Delta Cy3_{St}/\Delta Cy5_{St}$, aus den Differenzen für Experiment B (Oligo2b) der Quotient $Q_{BSi} = \Delta Cy3_{St}/\Delta Cy5_{St}$ gebildet. Als Maß für den Unterschied der Anreicherung von Oligo2a bzw. Oligo2b auf dem Stempel wurde der Quotient $Q_{St} = Q_{ASi}/Q_{BSi}$ gebildet. 5

10

Ergebnis

[0125] Für die Unterlage von Experiment 2b ergab sich der Wert $Q_{BU_{Unt}} = 0,36 \pm 0,08$ für die Unterlage von 2a $Q_{AU_{Unt}} = 0,69 \pm 0,09$. Hieraus ergab sich $Q_{Unt} = Q_{AU_{Unt}}/Q_{BU_{Unt}} = 1,92$. 15

[0126] Für den Stempel von 2b ergab sich $Q_{BSi} = 0,61 \pm 0,08$, für den Stempel von 2a $Q_{ASi} = 1,20 \pm 0,08$. Hieraus ergab sich $Q_{St} = Q_{ASi}/Q_{BSi} = 1,97$.

[0127] Bei Experiment 2a handelte es sich um einen Kraftvergleich eines 30 bp-Duplex auf der Seite des Stempels und einen 20 bp-Duplex auf Seite der Unterlage. Betrachtet man das Ergebnis zu 2a ($Q_{AU_{Unt}} = 0,69$, $Q_{ASi} = 1,2$) isoliert, so läßt sich keine Aussage darüber treffen, ob einer der beiden Duplexe stabiler war, bzw. welcher der beiden beim Trennen des Stempels von der Unterlage häufiger zerriß als der andere. Eine solche Aussage aus Experiment 2a allein wäre nur möglich, wenn man aus den gemessenen Fluoreszenz-Intensitäten die tatsächlichen Stoffinengen an Cy3 und Cy5 berechnen könnte. Da beim vorliegenden Experiment entsprechende Eichwerte nicht vorliegen, soll zu dem Kraftvergleich des 30 bp-Duplex mit dem 20 bp-Duplex in Experiment 2a der Kraftvergleich des 20 bp-Duplex mit einem weiteren 20 bp-Duplex in Experiment 2b als Referenz herangezogen werden. 20

25

[0128] Die Quotienten aus Experiment 2a und Referenzexperiment 2b ergeben für die Unterlage $Q_{Unt} = Q_{AU_{Unt}}/Q_{BU_{Unt}} = 1,92$ und für den Stempel $Q_{St} = Q_{ASi}/Q_{BSi} = 1,97$. Dies bedeutet, daß auf der Unterlage 2a etwa 2 mal so viel Cy3-markierter Oligo weggestempelt wurde wie bei 2b und daß auf den Stempel etwa 2 mal so viel Cy3-markierter Oligo übertragen wurde wie bei 2b.

30

[0129] Für eine geeichte Messung, bei der die Fluoreszenzintensitäten direkt proportional zu den Stoffmengen von Cy3 und Cy5 ausfallen würden, würde man beim Referenzexperiment 2b aufgrund der gleichen Stabilität der beiden 20 bp-Duplexe ein $Q_{BU_{Unt}} = 0,5$ und ein $Q_{BSi} = 0,5$ erwarten. Der hier ermittelte $Q_{Unt} = 0,36$ ist gegenüber dem bei einer geeichten Messung zu erwartenden Ergebnis um den Faktor 1,39 zu klein. Korrigiert man Q_{Unt} um diesen Faktor auf 0,5, so erhält man für die Korrektur von Experiment 2a

35

$$Q_{AU_{Unt,corr.}} = Q_{AU_{Unt}} \times 1,39 = 0,69 \times 1,39 = 0,96.$$

40

[0130] Bei der Korrektur der Werte für die Stempel erhält man analog:

$$Q_{BSi_{corr.}} = 0,5$$

45

$$Q_{BSi} = 0,61 = 1,22 \times 0,5$$

$$Q_{ASi_{corr.}} = Q_{ASi}/1,22 = Q_{ASi} = 1,20/1,22 = 0,98$$

50

[0131] Hieraus kann geschlossen werden, daß es bei Experiment 2a zu einer Abreicherung des Oligo2a von der Unterlage bzw. einer Anreicherung von Oligo2a auf dem Stempel von ca. 97% kommt.

55

[0132] Fig. 9A und 9B zeigen eine Darstellung der Unterlage bzw. des Stempels nach dem Stempeln bei Experiment 2a. Fig. 9C und 9D zeigen eine Darstellung der Unterlage bzw. des Stempels nach dem Stempeln bei Experiment 2b.

[0133] Fig. 10A bis 10D zeigen das Ergebnis der Auswertung von Unterlage und Stempel nach Kraftvergleich mit Oligonukleotid 2a bzw. Oligonukleotid 2b. Es handelt sich um Ausschnitte von Fluoreszenzprofilen. Der Verlauf der Profile wird durch den Pfeil in Fig. 9C angedeutet. Die Maxima der Graphen entsprechen den hellen Gitterlinien, die nicht gestempelte Bereiche repräsentieren. Die zwischen den Peaks liegenden Minima entsprechen den dunklen Quadraten, von denen in Folge des Kontakts mit dem auf den Stempelfüßchen gebundenen Streptavidins Oligos weggestempelt wurden.

60

[0134] Q_{St} und Q_{Unt} ergaben, daß der Duplex zwischen Oligo2a und Oligo3 eine mindestens 50% größere Trennkraft aufweist als der Duplex zwischen Oligo2b und Oligo3.

65

DE 101 17 866 A 1

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Nanotype GmbH

5 <120> Verfahren und Vorrichtung zur Charakterisierung
und/oder zum Nachweis eines Bindungskomplexes

10 <130> differentieller Krafttest

<140>

<141>

15 <160> 4

20 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 30

<212> DNA

25 <213> Künstliche Sequenz

<220>

30 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Oligonukleotid

<400> 1

35 aaaaaaaaa tctccggctt tacggcgtat

30

40 <210> 2

<211> 72

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

45 <220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Oligonukleotid

50

<400> 2

ttgctccag actctctgct gaaagtccct ttgataatcg taacgagggg ttatacgccg 60
taaagccgga ga

72

55

<210> 3

<211> 62

60 <212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

65

DE 101 17 866 A 1

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Oligonukleotid 5

<400> 3
actctctgct gaaagtccct ttgataatcg taacgagggg ttatacgccg taaagccgga 60
ga 62 10

<210> 4
<211> 40 15
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220> 20
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
Oligonukleotid

<400> 4 25
aggactttc agcagagagt ctggagcaa aaaaaaaaaa 40

Patentansprüche 30

1. Verfahren zur Charakterisierung und/oder zum Nachweis eines Bindungskomplexes, mit den Schritten:
Bereitstellen eines ersten Bindungspartners und eines Konjugats aus einem zweiten und einem dritten Bindungspartner und Bereitstellen eines vierten Bindungspartners Bilden einer Verkettung der Bindungspartner, wobei der erste Bindungspartner mit dem zweiten Bindungspartner einen Probenkomplex und der dritte Bindungspartner mit dem vierten Bindungspartner einen Referenzkomplex ausbildet, 35
Aufbringen einer Kraft an die Verkettung, die zur Trennung des Probenkomplexes oder des Referenzkomplexes führt und
Bestimmen welcher der beiden Bindungskomplexe getrennt wurde.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei zunächst das Konjugat aus dem zweiten und dritten Bindungspartner bereitgestellt wird und anschließend der Probenkomplex und/oder der Referenzkomplex gebildet wird. 40
3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei zunächst der Probenkomplex und/oder der Referenzkomplex gebildet wird und anschließend das Konjugat durch Verbinden des zweiten und dritten Bindungspartners bereitgestellt wird.
4. Verfahren nach Anspruch 3, mit den Schritten Immobilisieren des ersten Bindungspartners an einer ersten Halteinrichtung, Immobilisieren des vierten Bindungspartners an einer zweiten Halteinrichtung, Herstellen des Probenkomplexes durch In-Kontakt-Bringen des immobilisierten ersten Bindungspartners mit dem zweiten Bindungspartner, Herstellen des Referenzkomplexes durch In-Kontakt-Bringen des immobilisierten vierten Bindungspartners mit dem dritten Bindungspartner, Annähern der ersten und zweiten Halteinrichtung, wobei der zweite und dritte Bindungspartner miteinander in Wechselwirkung treten können. 45
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei der erste Bindungspartner und der vierte Bindungspartner gleich sind.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei es sich bei dem ersten und dem zweiten Bindungspartner um einen Liganden und einen Rezeptor handelt, die spezifisch aneinander binden.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei der Probenkomplex auf einer unspezifischen Wechselwirkung beruht. 55
8. Verfahren nach Ansprüche 1 bis 7, wobei der Referenzkomplex auf einer spezifischen oder einer unspezifischen Wechselwirkung beruht.
9. Verfahren nach Ansprüche 1 bis 8, wobei mindestens einer der Bindungspartner vorzugsweise des Probenkomplexes ein Körper ist.
10. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei mindestens einer der Bindungspartner des Probenkomplexes ein Biomolekül ist. 60
11. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei der erste und/oder zweite Bindungspartner an einer ersten bzw. zweiten Halteinrichtung befestigt werden, die vorzugsweise jeweils einen Körper aufweisen.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 11, wobei mindestens ein Körper eine makroskopisch große Oberfläche aufweist, mit der vorzugsweise mehrere Probenkomplexe und/oder Referenzkomplexe verbindbar sind. 65
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 12, wobei mindestens ein Körper nanoskopisch klein ist, vorzugsweise ausgewählt aus einer Gruppe, die Partikel, magnetische Partikel, paramagnetische Partikel, diamagnetische Partikel, Kolloide, Moleküle, geladene Moleküle, Polymere, und vielfach geladene Polymere aufweist.

DE 101 17 866 A 1

14. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Kraft zur Trennung der Verkettung durch einen makroskopischen Zug aufgebracht wird.
15. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Kraft durch ein magnetisches Feld aufgebracht wird.
- 5 16. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Kraft durch eine hydrodynamische Strömung aufgebracht wird.
17. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Kraft durch Einkoppeln von Schallwellen, vorzugsweise Ultraschallwellen aufgebracht wird.
- 10 18. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Kraft durch Aufbringen elektrostatischer Kräfte aufgebaut wird.
19. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Kraft durch molekulare Konformationsänderungen von Aufhängungen und/oder der Verbindungen aufgebracht wird.
- 15 20. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei eine Kraft unter Einhaltung einer bestimmten Kraftrate angelegt wird.
21. Verfahren nach Anspruch 20, wobei das Einstellen der Kraftrate über die Ziehgeschwindigkeit erfolgt, mit der die Halteeinrichtungen getrennt werden.
22. Verfahren nach Anspruch 20 oder 21, wobei das Einstellen der Kraftrate über die Federkonstante der Verkettung mit ihren Anbindungen erfolgt.
23. Verfahren nach Anspruch 22, wobei das Einstellen der Federkonstante über die Variation der Länge eines Polymers aus dem die Anbindungen der Liganden bzw. die Verbindung, die die Rezeptoren verbindet, erfolgt.
- 20 24. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei ein Probenkomplex und/oder ein Referenzkomplex mindestens einen Bestandteil aufweist, der ausgewählt wird aus einer Gruppe, die niedermolekulare Substanzen, Polymere, Proteine, Antikörper, Antigene, Haptene, natürliche oder künstliche Nukleinsäuren, Partikel, Viren, Phagen, Zellen, Zellbestandteile und/oder komplexbildende Substanzen wie Chelatoren aufweist.
- 25 25. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 24, mit den Schritten Immobilisieren des ersten Bindungspartners an einer ersten Halteeinrichtung, Immobilisieren des vierten Bindungspartners an einer zweiten Halteeinrichtung, Bereitstellen eines Konjugats aus dem zweiten und dritten Bindungspartner, das die Probe darstellt, wobei der zweite Bindungspartner an den ersten Bindungspartner binden kann und der dritte Bindungspartner an den vierten Bindungspartner binden kann, Annähern der ersten und der zweiten Halteeinrichtung, wobei die Bindungspartner der Probe mit den beiden anderen zugeordneten Bindungspartnern in Wechselwirkung treten können.
- 30 26. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 24, mit den Schritten Immobilisieren des ersten Bindungspartners, der die Probe darstellt, an einer ersten Halteeinrichtung, Immobilisieren des vierten Bindungspartners an einer zweiten Halteeinrichtung, Bereitstellen eines Konjugats aus dem zweiten und dem dritten Bindungspartner, wobei der zweite Bindungspartner an die Probe binden kann, und der dritte Bindungspartner an den vierten Bindungspartner binden kann, Annähern der ersten und der zweiten Halteeinrichtung, wobei die zugeordneten Bindungspartner in Wechselwirkung treten können.
- 35 27. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche mit dem Schritt, Markieren des Probenkomplexes und/oder des Referenzkomplexes, vorzugsweise mindestens eines Bindungspartners und indirekte oder direkte Detektion der Trennstelle, die sich nach dem Aufbringen der Kraft ergibt.
- 40 28. Verfahren nach Anspruch 27, wobei das Konjugat aus zweitem und drittem Bindungspartner, der zweite Bindungspartner oder der dritte Bindungspartner mit einer ersten Markierung versehen werden, und der erste oder der vierte Bindungspartner mit einer zweiten Markierung versehen werden, die von der ersten Markierung verschieden ist.
- 45 29. Verfahren nach Anspruch 28, wobei die Detektion der Trennstelle dadurch erfolgt, daß man die Menge an erster Markierung ermittelt, die an eine der Halteeinrichtungen gebunden ist, die Menge an zweiter Markierung ermittelt, die an dieselbe Halteeinrichtung gebunden ist, und die ermittelten Werte miteinander vergleicht und/oder zueinander in Beziehung setzt.
- 30 30. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 29, wobei die Markierung durch fluoreszierende Moleküle erfolgt.
- 50 31. Verfahren nach Anspruch 30, wobei ein Bindungspartner eines Bindungskomplexes mit einem ersten Fluorophor und der zweite Bindungspartner mit einem zweiten Fluorophor versehen ist, zwischen denen ein Fluoreszenz Resonanz Transfer (FRET) stattfindet.
32. Verfahren nach Anspruch 30, wobei ein Bindungspartner eines Bindungskomplexes mit einem Fluorophor und der zweite Bindungspartner mit einem Molekül versehen ist, der die Fluoreszenz des Fluorophors auslöscht (quenching).
- 55 33. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 29, wobei es sich bei der Markierung um fluoreszierende nanoskopische Halbleiterpartikel (quantum dots) handelt.
34. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 29, wobei es sich um eine radioaktive Markierung handelt.
35. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 29, wobei es sich bei der Markierung um ein Enzym oder einen Affinitätsmarker handelt, an den ein Enzym binden kann, das durch eine Reaktion einen Signalstoff entwickelt.
- 60 36. Verfahren nach Anspruch 35, wobei an die Trennung eines Komplexes die Aktivierung eines Enzyms gekoppelt ist, welches ein detektierbares Signal entwickelt.
37. Verfahren nach einem der Ansprüche 27 bis 29, wobei es sich bei der Markierung um ein Molekül der Elektrolumineszenz, ein elektrochemisch detektierbares Molekül oder um eine Massenmarkierung handelt, die durch Massenspektroskopie nachgewiesen werden kann.
- 65 38. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 37, wobei das Verfahren während eines Meßvorgangs an vielen gleichartigen Verkettungen durchgeführt wird.
39. Verfahren nach Anspruch 38, wobei nur eine Art Verkettung bei nur einer Kraftrate getestet wird, wobei die Verkettung stets den gleichen Probenkomplex und stets den gleichen Referenzkomplex beinhaltet.

DE 101 17 866 A 1

40. Verfahren nach Anspruch 39, wobei nur eine Art Verkettung bei verschiedenen Kraftraten getestet wird, wobei die Verkettung stets den gleichen Probenkomplex und stets den gleichen Referenzkomplex beinhaltet. 5

41. Verfahren nach Anspruch 38, wobei verschiedene Verkettungen bei nur einer Kraftrate getestet werden, wobei die Verkettungen stets den gleichen Probenkomplex aber verschiedene Referenzkomplexe mit verschiedenen Trennkräften beinhaltet. 10

42. Verfahren nach Anspruch 38, wobei verschiedene Verkettungen bei verschiedenen Kraftraten getestet werden, wobei die Verkettungen stets den gleichen Probenkomplex aber verschiedene Referenzkomplexe mit verschiedenen Trennkräften beinhaltet. 10

43. Verfahren nach einem der Ansprüche 40 bis 42, wobei die Verkettungen seriell an nur einem Ansatz getestet werden. 10

44. Verfahren nach einem der Ansprüche 40 bis 42, wobei die verschiedenen Verkettungen bzw. Kraftraten in separaten Ansätzen vorzugsweise parallel getestet werden. 10

45. Vorrichtung zur Charakterisierung und/oder zum Nachweis eines Bindungskomplexes, mit: einem ersten Bindungspartner und einem Konjugat aus einem zweiten und einem dritten Bindungspartner und einem vierten Bindungspartner. 15

einer Einrichtung zum Verketten der Bindungspartner, wobei der erste Bindungspartner mit dem zweiten Bindungspartner einen Probenkomplex und der dritte Bindungspartner mit dem vierten Bindungspartner einen Referenzkomplex ausbildet.

einer Einrichtung zum Aufbringen einer Kraft an die Verkettung, die zur Trennung des Probenkomplexes oder des Referenzkomplexes führt und 20

einer Einrichtung zum Bestimmen welcher der beiden Bindungskomplexe getrennt wurde. 20

46. Vorrichtung nach Anspruch 45, wobei zunächst das Konjugat aus dem zweiten und dritten Bindungspartner bereitgestellt wird und anschließend der Probenkomplex und/oder der Referenzkomplex gebildet wird. 25

47. Vorrichtung nach Anspruch 45, wobei zunächst der Probenkomplex und/oder der Referenzkomplex gebildet wird und anschließend das Konjugat durch Verbinden des zweiten und dritten Bindungspartners bereitgestellt wird. 25

48. Vorrichtung nach Anspruch 47, wobei der erste Bindungspartner an einer ersten Halteeinrichtung immobilisiert ist, der vierte Bindungspartner an einer zweiten Halteeinrichtung immobilisiert ist, der zweite Bindungspartner mit dem ersten Bindungspartner den Probenkomplex bildet, und der dritte Bindungspartner mit dem vierten Bindungspartner den Referenzkomplex bildet, und mit einer Einrichtung zum Annähern der ersten und der zweiten Halteeinrichtung, wobei der zweite und der dritte Bindungspartner in Wechselwirkung treten können. 30

49. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 45 bis 48, wobei der erste Bindungspartner und der vierte Bindungspartner gleich sind. 30

50. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 45 bis 49, wobei es sich bei dem ersten und dem zweiten Bindungspartner um einen Liganden und einen Rezeptor handelt, die spezifisch aneinander binden. 35

51. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 45 bis 49, wobei der Probenkomplex auf einer unspezifischen Wechselwirkung beruht. 35

52. Vorrichtung nach Ansprüche 45 bis 51, wobei der Referenzkomplex auf einer spezifischen oder einer unspezifischen Wechselwirkung beruht. 40

53. Vorrichtung nach Ansprüche 45 bis 52, wobei mindestens einer der Bindungspartner vorzugsweise des Probenkomplexes ein Körper ist. 40

54. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 45 bis 53, wobei mindestens einer der Bindungspartner des Probenkomplexes ein Biomolekül ist. 40

55. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 45 bis 54, wobei der erste und/oder zweite Bindungspartner an einer ersten bzw. zweiten Halteeinrichtung befestigt werden, die vorzugsweise jeweils einen Körper aufweisen. 45

56. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 53 bis 55, wobei mindestens ein Körper eine makroskopisch große Oberfläche aufweist, mit der vorzugsweise mehrere Probenkomplexe und/oder Referenzkomplexe verbindbar sind. 45

57. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 53 bis 56, wobei mindestens ein Körper nanoskopisch klein ist, vorzugsweise ausgewählt aus einer Gruppe, die Partikel, magnetische Partikel, paramagnetische Partikel, diamagnetische Partikel, Kolloide, Moleküle, geladene Moleküle, Polymere, und vielfach geladene Polymere aufweist. 50

58. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 45 bis 57, wobei die Krafteinrichtung zur Trennung der Verkettung eine Einrichtung zum Aufbringen eines makroskopischen Zugs aufweist. 50

59. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 45 bis 58, mit einer Einrichtung zum Aufbringen von magnetischen Kräften. 55

60. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 45 bis 59, mit einer Einrichtung zum Aufbringen von hydrodynamischen Kräften. 55

61. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 45 bis 60, mit einer Einrichtung zum Einkoppeln von Schallwellen, vorzugsweise Ultraschallwellen. 55

62. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 45 bis 61, mit einer Einrichtung zum Aufbringen von elektrostatischen Kräften. 60

63. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 45 bis 62, mit einer Einrichtung zum Bewirken von molekularen Konformationsänderungen von Aufhängungen und/oder der Verbindungen. 60

64. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 45 bis 63, wobei die Kraft unter Einhaltung einer bestimmten Kraftrate angelegt wird. 60

65. Vorrichtung nach Anspruch 64, mit einer Einrichtung zum Einstellen der Kraftrate, vorzugsweise der Ziehgeschwindigkeit, mit der die Halteeinrichtungen getrennt werden. 65

66. Vorrichtung nach Anspruch 64 oder 65, wobei die Kraftrate über die Federkonstante der Verkettung mit ihren Anbindungen einstellbar ist. 65

67. Vorrichtung nach Anspruch 66, wobei die Federkonstante über die Variation der Länge eines Polymers aus dem

DE 101 17 866 A 1

die Anbindungen der Liganden bzw. die Verbindung, die die Rezeptoren verbindet, einstellbar ist.

5 68. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 45 bis 67, wobei ein Probenkomplex und/oder ein Referenzkomplex mindestens einen Bestandteil aufweist, der ausgewählt wird aus einer Gruppe, die niedermolekulare Substanzen, Polymere, Proteine, Antikörper, Antigene, Haptene, natürliche oder künstliche Nukleinsäuren, Partikel, Viren, Phagen, Zellen, Zellbestandteile und/oder komplexbildende Substanzen wie Chelatoren aufweist.

10 69. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 45 bis 68, wobei der erste Bindungspartner an einer ersten Haltevorrichtung immobilisiert ist, der vierte Bindungspartner an einer zweiten Halteeinrichtung immobilisiert ist, ein Konjugat aus dem zweiten und dritten Bindungspartners besteht, das die Probe darstellt, wobei der zweite Bindungspartner an den ersten Bindungspartner binden kann und der dritte Bindungspartner an den vierten Bindungspartner binden kann, und mit einer Einrichtung zum Annähern der ersten und der zweiten Halteeinrichtung, wobei die Bindungspartner der Probe mit den beiden anderen zugeordneten Bindungspartnern in Wechselwirkung treten können.

15 70. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 45 bis 68, wobei der erste Bindungspartner, der die Probe darstellt, an einer ersten Halteeinrichtung immobilisiert ist, der vierte Bindungspartner an einer zweiten Halteeinrichtung immobilisiert ist, ein Konjugat aus dem zweiten und dem dritten Bindungspartner besteht, wobei der zweite Bindungspartner an die Probe binden kann, und der dritte Bindungspartner an den vierten Bindungspartner binden kann, und mit einer Einrichtung zum Annähern der ersten und der zweiten Halteeinrichtung, wobei die zugeordneten Bindungspartner in Wechselwirkung treten können.

20 71. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 45 bis 70 mit einer Markierung an dem Probenkomplex und/oder dem Referenzkomplex, vorzugsweise mindestens einem Bindungspartner und einer Einrichtung zum indirekten oder direkten Detektieren der Trennstelle, die sich nach dem Aufbringen der Kraft ergibt.

72. Vorrichtung nach Anspruch 71 mit einer ersten Markierung an dem Konjugat aus dem zweiten und dritten Bindungspartner und einer zweiten Markierung an dem ersten oder vierten Bindungspartner, wobei die zweite Markierung von der ersten Markierung verschieden ist.

25 73. Vorrichtung nach Anspruch 71 oder 72, wobei die Markierung durch fluoreszierende Moleküle erfolgt.

74. Vorrichtung nach Anspruch 73, wobei ein Bindungspartner eines Bindungskomplexes mit einem ersten Fluorophor und der zweite Bindungspartner mit einem zweiten Fluorophor versehen ist, zwischen denen ein Fluoreszenz Resonanz Transfer (FRET) stattfindet.

30 75. Vorrichtung nach Anspruch 73, wobei ein Bindungspartner eines Bindungskomplexes mit einem Fluorophor und der zweite Bindungspartner mit einem Molekül versehen ist, der die Fluoreszenz des Fluorophors auslöscht (quenching).

76. Vorrichtung nach Anspruch 71 oder 72, wobei es sich bei der Markierung um fluoreszierende nanoskopische Halbleiterpartikel (quantum dots) handelt.

35 77. Vorrichtung nach Anspruch 71 oder 72, wohei die Markierung radioaktiv ist.

78. Vorrichtung nach Anspruch 71 oder 72, wobei die Markierung ein Enzym oder einen Affinitätsmarker aufweist, an den ein Enzym binden kann, das durch eine Reaktion einen Signalstoff entwickelt.

79. Vorrichtung nach Anspruch 78, wobei an die Trennung eines Komplexes die Aktivierung eines Enzyms gekoppelt ist, welches ein detektierbares Signal entwickelt.

40 80. Vorrichtung nach Anspruch 71 oder 72, wobei es sich bei der Markierung um ein Molekül der Elektrolumineszenz, ein elektrochemisch detektierbares Molekül oder um eine Massenmarkierung handelt, die durch Massenspektroskopie nachgewiesen werden kann.

81. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 45 bis 80, mit vielen gleichartigen Verkettungen, an denen der Meßvorgang durchgeführt wird.

45 82. Vorrichtung nach Anspruch 81, wobei nur eine Art Verkettung bei nur einer Kraftrate getestet wird, wobei die Verkettung stets den gleichen Probenkomplex und stets den gleichen Referenzkomplex beinhaltet.

83. Vorrichtung nach Anspruch 81, wobei nur eine Art Verkettung bei verschiedenen Kraften getestet wird, wobei die Verkettung stets den gleichen Probenkomplex und stets den gleichen Referenzkomplex beinhaltet.

50 84. Vorrichtung nach Anspruch 81, wobei verschiedene Verkettungen bei nur einer Kraftrate getestet werden, wobei die Verkettungen stets den gleichen Probenkomplex aber verschiedene Referenzkomplexe mit verschiedenen Trennkräften beinhaltet.

85. Vorrichtung nach Anspruch 81, wobei verschiedene Verkettungen bei verschiedenen Kraften getestet werden, wobei die Verkettungen stets den gleichen Probenkomplex aber verschiedene Referenzkomplexe mit verschiedenen Trennkräften beinhalten.

55 86. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 83 bis 85, wobei die Verkettungen seriell an nur einem Ansatz getestet werden.

87. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 83 bis 85, wobei die verschiedenen Verkettungen bzw. Kraften in separaten Ansätzen vorzugsweise parallel getestet werden.

60 88. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 45 bis 87, wobei die Trennkräfte der Referenzkomplexe so gewählt sind, daß sich die Trennkraft des Probenkomplexes näherungsweise bestimmen läßt.

89. Kit zum Nachweis eines Bindungskomplexes zum Durchführen eines Verfahrens nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 44.

90. Kit zum Nachweis eines Bindungskomplexes mit den Einrichtungen nach mindestens einem der Ansprüche 45 bis 88.

Hierzu 13 Seite(n) Zeichnungen

65

- Leerseite -

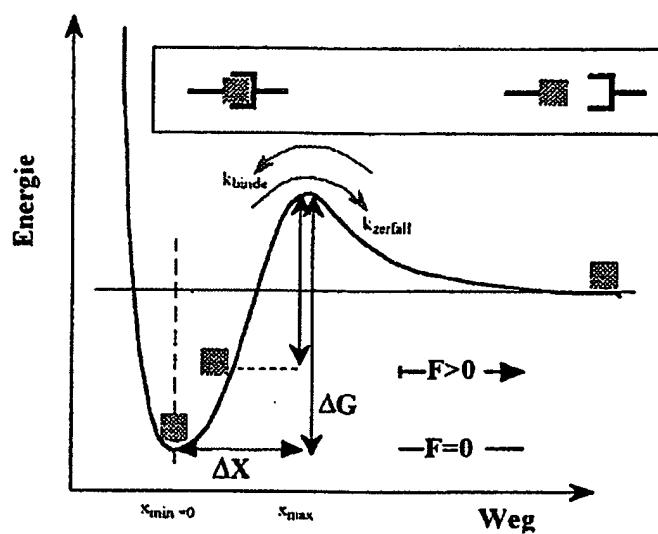


Fig. 1

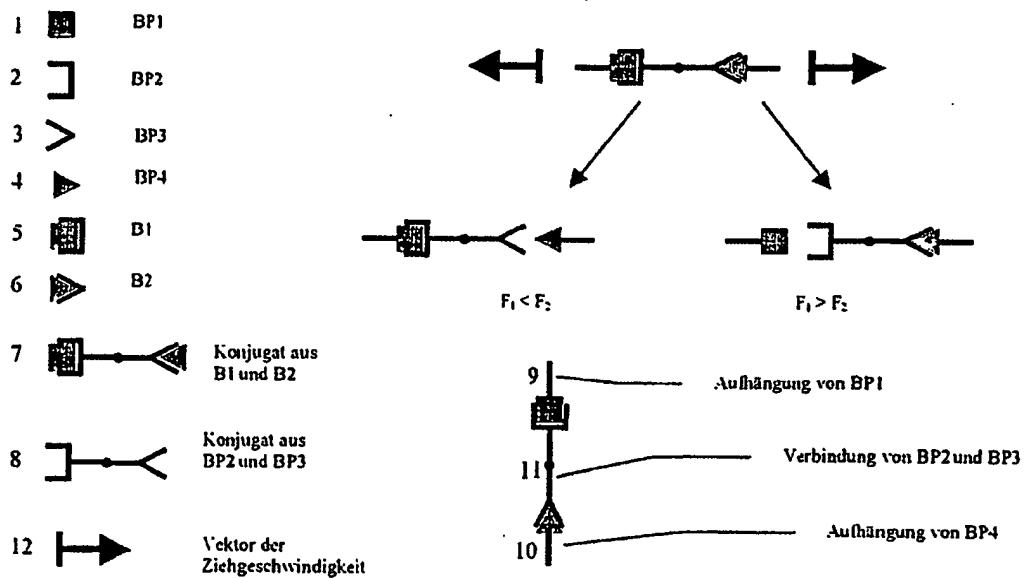


Fig. 2

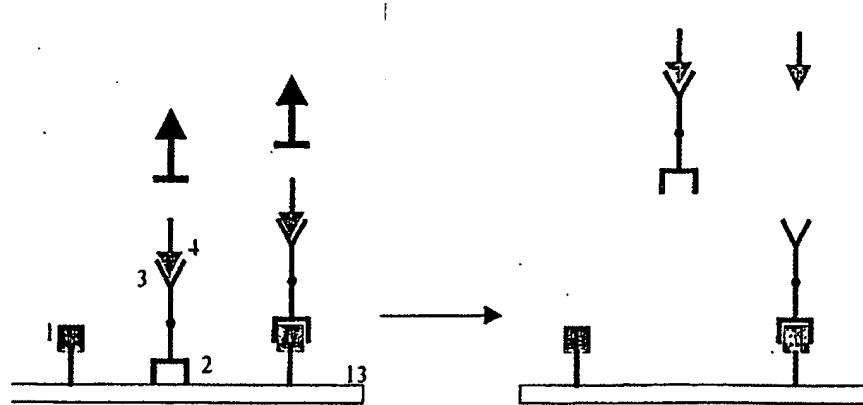


Fig. 3

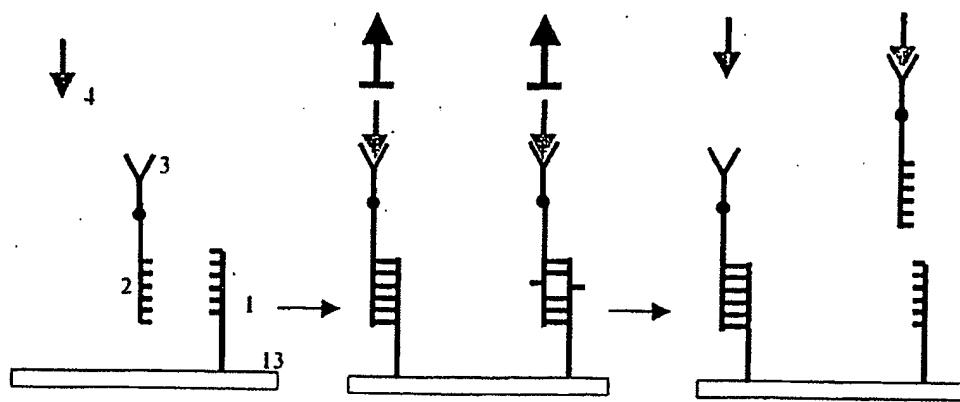
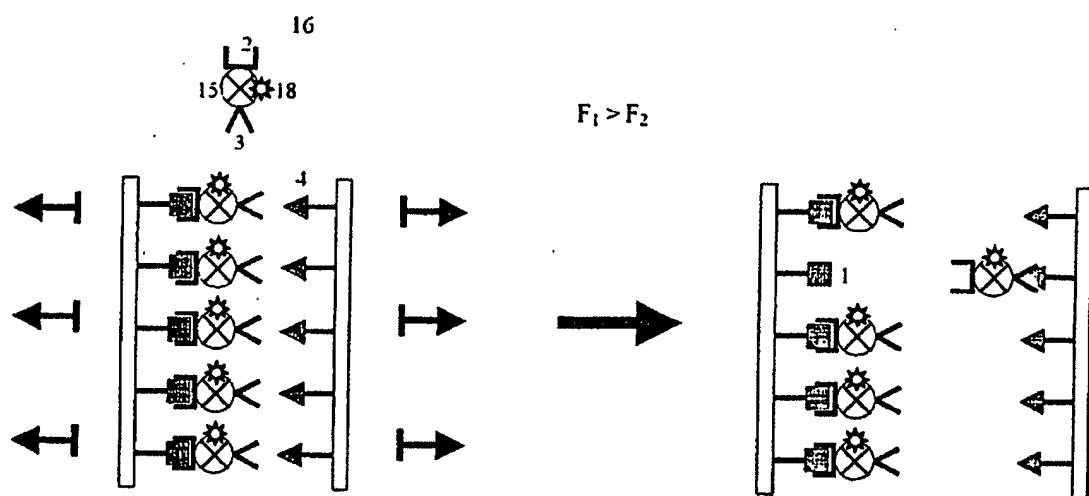


Fig. 4



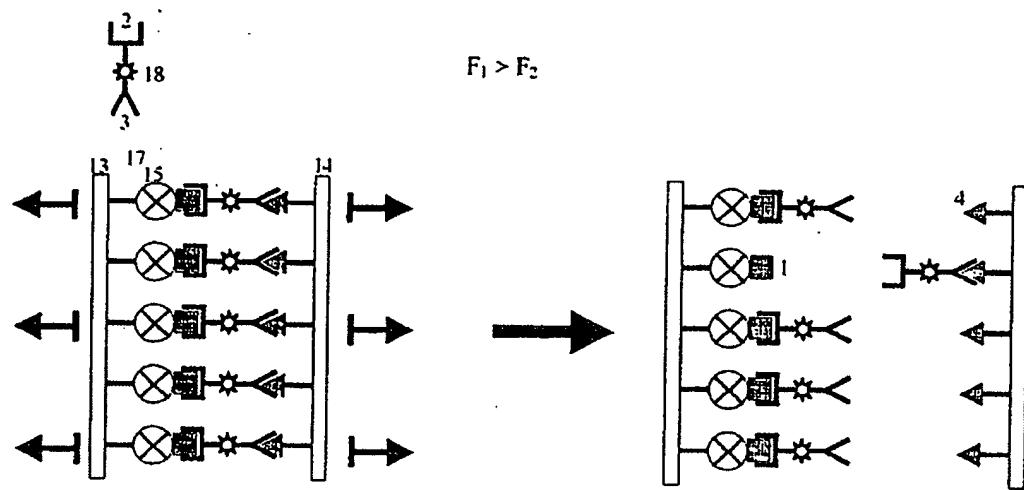


Fig. 6

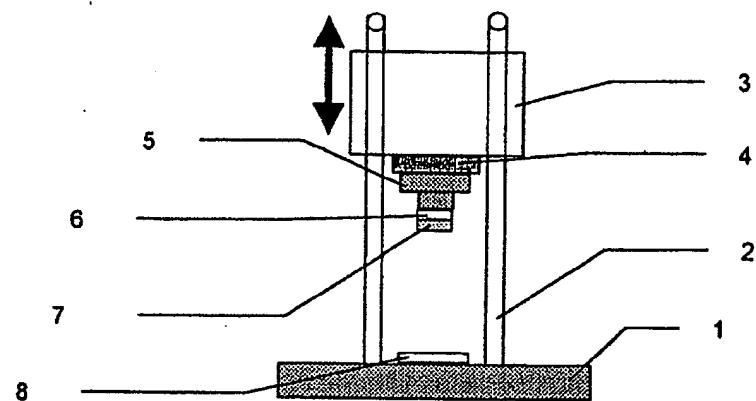
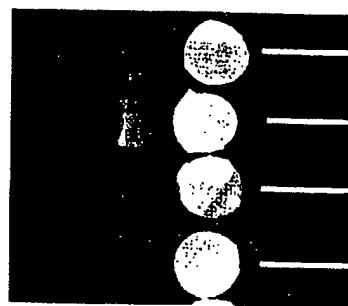
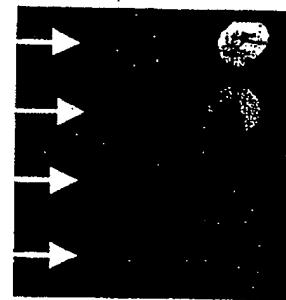


Fig. 7

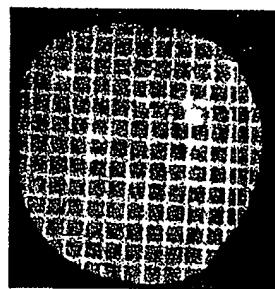


A

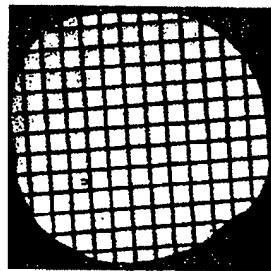


B

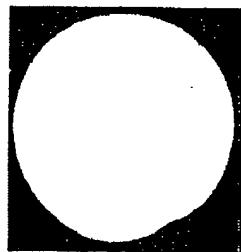
Figur 8



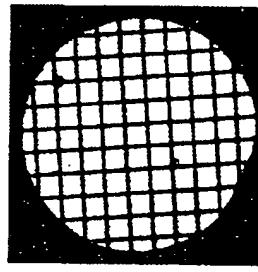
Figur 9A



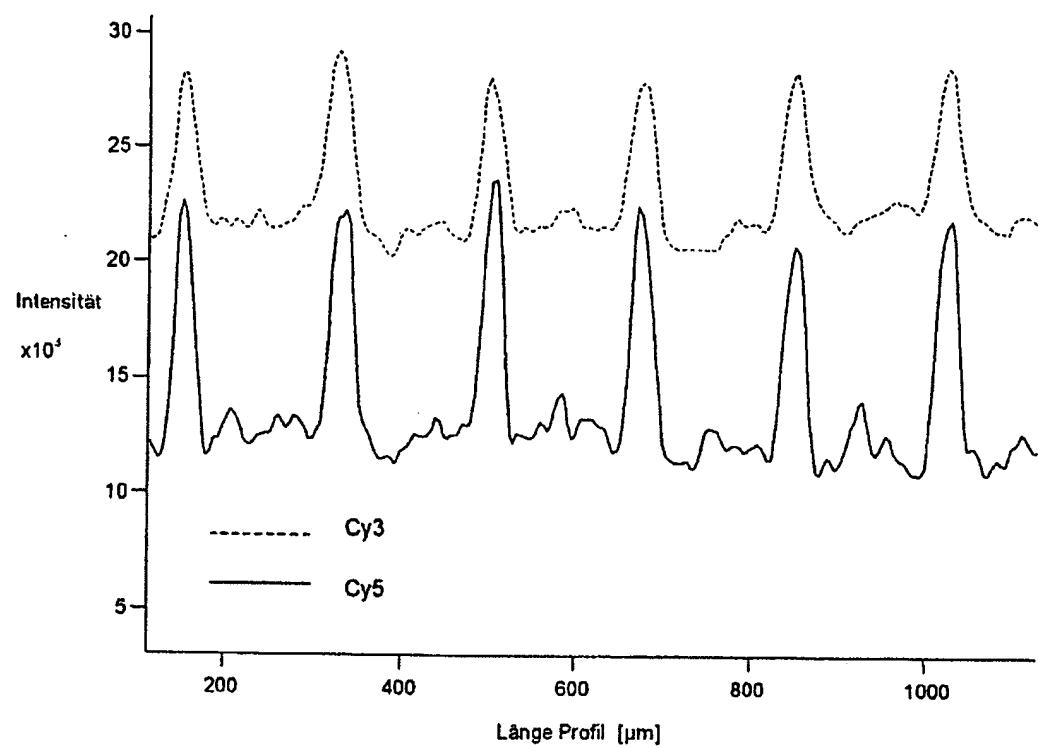
Figur 9B



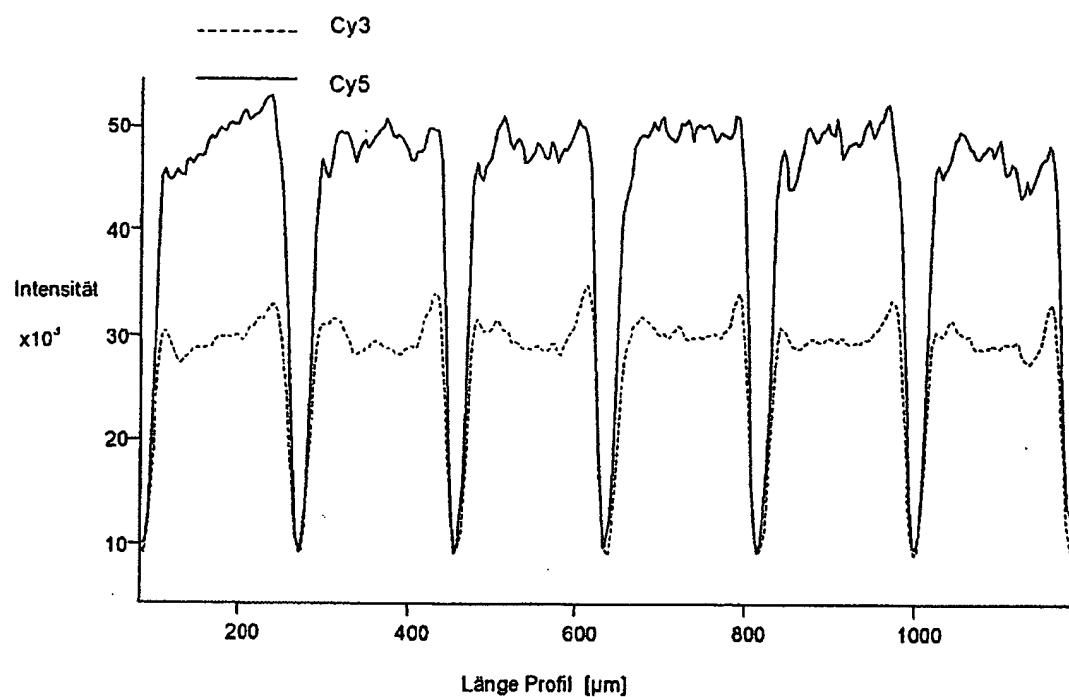
Figur 9C



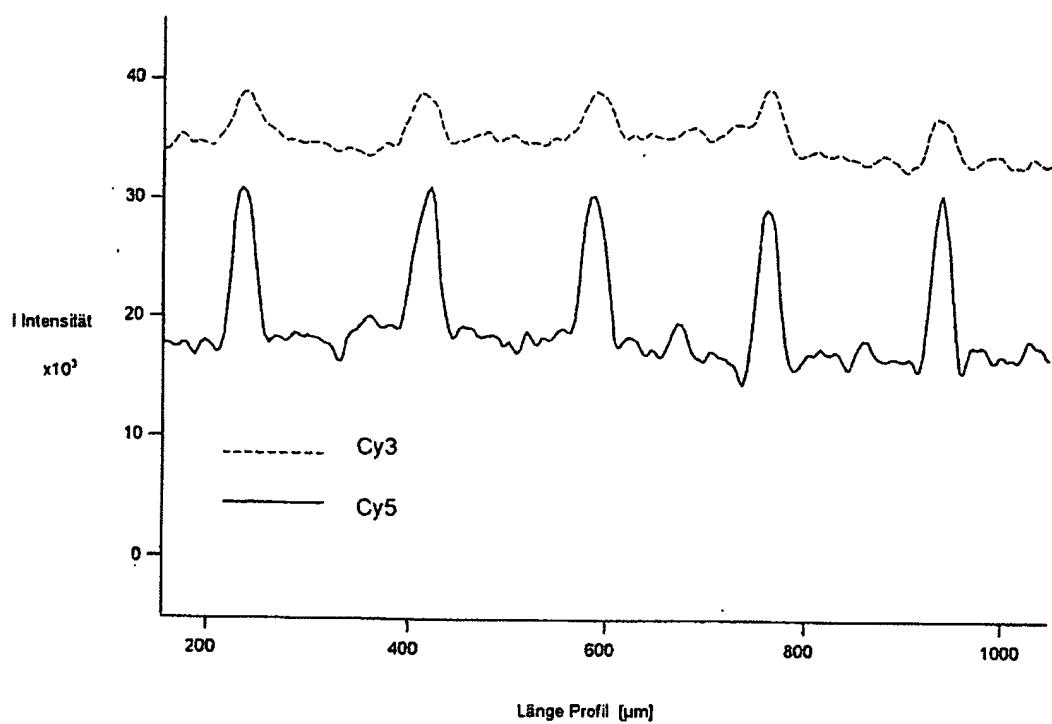
Figur 9D



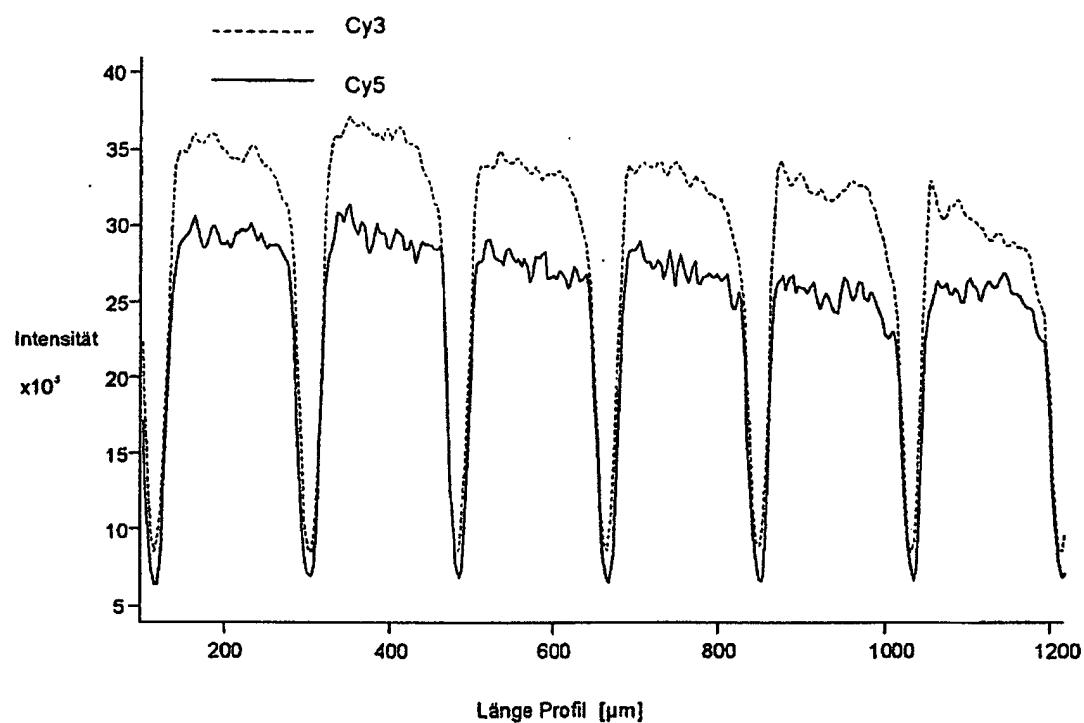
Figur 10A



Figur 10B



Figur 10C



Figur 10D